

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業
食品由来が疑われる有症事案に係る調査（食中毒調
査）の迅速化・高度化に関する研究
（H29-食品-一般-001）

平成 29 年度～令和元年度 総合研究報告書

研究代表者 大西 真

令和 2 年（2020 年） 3 月

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業
食品由来が疑われる有症事案に係る調査（食中毒調査）の
迅速化・高度化に関する研究班
平成 29 年度～令和元年度 総合研究報告書

目次

- I. 平成 29 年度～令和元年度 総合研究報告書
食品由来が疑われる有症事案に係る調査（食中毒調査）の迅速化・高度化に関する研究
研究代表者 大西 真 国立感染症研究所 1
- II. 平成 29 年度～令和元年度 分担研究報告書
1. EHEC 0103, 0121 に対する IS-P 法の開発に関する研究
研究分担者 林 哲也 九州大学・大学院医学研究院 10
2. 腸管出血性大腸菌 0111 に対する IS-printing 法の開発に関する研究
研究分担者 大岡 唯祐 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・微生物学 16
3. 迅速化に向けた簡易法の開発-2（EHEC-POT 法）
研究分担者 鈴木 匡弘 藤田医科大学医学部微生物学講座 34
4. 食品媒介感染症・食中毒の疫学調査手法の整備に関する研究
研究分担者 砂川 富正 国立感染症研究所感染症疫学センター 39

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総合研究報告書

食品由来が疑われる有症事案に係る調査（食中毒調査）の迅速化・高度化に関する研究

研究代表者 大西 真 （国立感染症研究所細菌第一部・部長）
 研究分担者 林 哲也 （九州大学・大学院医学研究院・教授）
 研究分担者 大岡 唯祐（鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・微生物学・講師）
 研究分担者 鈴木 匡弘 （藤田医科大学・医学部・准教授）
 研究分担者 砂川 富正 （国立感染症研究所感染症疫学センター・室長）

研究要旨

腸管出血性大腸菌の調査を高度化するためのツール開発を行なった。IS-printing (IS-P) 法はスクリーニング法として各地の地方衛生研究所等で広く使用されているが、現時点では O157 と O26 のみに適用可能である。

IS-P に関して、EHEC O121 と O111 用のプロトタイプの検証が、全国地方衛生研究所の協力で実施された。問題点を抽出し、開発系の改善等を実施した。EHEC O103 用の解析系を含めほぼ実用化に向けての検証が終了した。またまた、迅速・簡易な分子疫学解析法として利用されている PCR based ORF typing (POT) 法の検証も、全国地方衛生研究所の協力で実施された。O121 及び O157 以外の多様な血清型において $D_{index} 0.997$ (O111) ~0.961 (O145) と良好な菌株識別能力を実現した。全国の地方衛生研究所で実施可能としていくことで、希な血清型の EHEC 感染症監視に貢献できると期待される。IS-P および POT 法よりも高精度な手法である MLVA 法も実際に使用し、データの蓄積がなされた。

A. 研究目的

食中毒調査においては、迅速な探知が原因食品を市場から取り除くことにつながるため、全国地方衛生研究所（地衛研）と国立感染症研究所は EHEC 分離株の分子型別が実施されてきた。各型別法には時間、労力、解像度、多施設間比較の面で長所、短所があるため、複数の方法を組み合わせることで目的に応じて使い分けている。スクリーニング法として IS-printing (IS-P) 法が開発され (Ooka et al. J Clin Microbiol 2009, Mainil et al. J Appl Microbiol 2011)、解像度は低いが簡便・迅速・多施設間比較が容易な IS-P 法で一致した菌株は高解像度である PFGE 法で確認する手順が広がった。さらに、高解像度に多検体解析可能な MLVA 法 (Izumiya et al. Microbiol Immunol. 2010) が感染研と一部の地衛研で実施可能となり、IS-P 法と MLVA 法との組み合わせが最も迅速に結果が得られると考えられてきた。しかし、IS-P 法は O157 と O26 のみに、MLVA 法は O157, O26, O111 のみに可能であり、対象の拡大が望まれる。また、近年、新規簡易迅速型別法 (PCR-based ORF typing, POT 法) が開発され、様々な病原細菌に応用されてきた。本研究では IS-P 法 (O111, O103, O121)、

EHEC-POT 法については不足するゲノム情報の取得とシステムの開発を H30 年度までに実施し、H31 年度には地方衛生研究所で試行する。MLVA 法に関しては、O103, O121, O145 解析用システムを H29 年度に開発し、H30 年度は試行、H31・R1 年度には実用化する計画を立てた。また、わが国では分子型別法データと疫学情報との統合が困難となっているため、分子型別法の結果と疫学情報を効率良く簡便に統合するシステムも合わせて開発することとした。

B. 研究方法

分担研究の研究の詳細は各分担報告書に詳述されている。

MLVA 法の検証: MLVA 法の対象を広げるための新規プライマーセット (MLVA43) を利用して、EHEC O103, O121, O145, O165, O91 を解析し、解像度 Simpson's 多様性指数 (SDI) を求めた。

C. 研究結果

(1) MLVA43 法を用いた高精度解析系の開発
 EHEC O157, O26, O111 用に利用している 17 遺伝子座を用いた MLVA17 法と新規に設定した 26 遺伝

子座を加えた MLVA43 法を比較した。MLVA17 の解析結果と比較して、血清群特異的な MLVA 型が得られることが示唆された。また、同一血清群は 1 あるいは 2 のクラスターに収束し、それぞれのクラスター内の多様性も認められ、良好な MLVA 法が作成されたことが示唆された。各血清群の解析株数と MLVA 型数、および多様性指数を表 1 に示した。全ての血清群の解析において MLVA43 法で見出された型数は、MLVA17 法で見出された型数より多かった。さらに、多様性指数もより高い値を示した。121 および 0145 を対象にした MLVA17 法は多様性指数が 0.9 を下回っていたが、これらの血清群に対しても MLVA43 法は 0.9 以上の多様性指数を示した。

2019 年に国立感染症研究所に分子型別解析依頼があった、腸管出血性大腸菌 2863 株のうち、0103, 0121, 0145, 0165, 091 が 426 株存在した (0103 株 = 206 株、0121 株 = 81 株、0145 株 = 93 株、0165 株 = 4 株、091 株 = 42 株)。MLVA43 法により、各血清群の菌株に対する多様性指数は EHEC 0103 = 0.878, 0121 = 0.936, 0145 = 0.830, 0165 = 0.750, 091 = 0.971 であった (表 1)。2018 年分離株を用いた解像度の解析と比較して 0145 分離株の解像度が低下したが、これは 8 月下旬から 9 月上旬にかけて東海地方を中心に集積した 19m6006 型 (34 株) によって、見かけ上の解像度の低下と考えられた。

感染研に MLVA43 依頼があった EHEC 菌株の分離日から感染県受領までの日数を図 1 に示した。迅速な解析が可能な MLVA 法であるが、感染研が菌株を受領するまでの日数が 2 週間以内に受領される菌株は 17.7%、4 週間以内のものでも半数にみえない (43.3%)。

感染研に EHEC 分離株の MLVA43 を依頼した施設は 94 施設であった。一方で、EHEC 0157/026/0111 用の解析手法である MLVA17 法を実施する地方衛生研究所 (計 27 機関) が増加し、2018 年 (13 機関) と比較すると倍増した。2018 年より MLVA データに基づいた MLVA 型名の付与は感染研で実施し、地方自治体、厚労省と共有されるようになった。2019 年は 0157/026/0111、計 650 株のデータの型名付けが感染研でなされた。分離日からデータ受領までの日数が 4 週間以内であったものが約 7 割であった (69.8%)。2 週間以内に MLVA データを受付し MLVA 型が共有された菌株数は 36.6% を占めた。施設毎で感染研へデータを送付するまでの日数は異なることが示された。各施設において菌株を病院・検査会社から入手するまでの手順・時間が異なることによって、MLVA 解析データの共有にかかる時間が影響されているのかもしれない。

れない。

林による分担研究では

1. ゲノム情報の取得と系統解析
2. 系統解析
3. IS 検索と標的 IS の決定
4. 標的部位の選定と開発パイプラインの構築
5. IS-P_O121 プロトタイプの実験と検証及び開発パイプライン等の改良
6. IS-P_O121 と IS-P_O103 最終版の実験の各項目で結果が得られた。詳細は、分担報告書を参照されたい。

大岡による分担研究では

- 1) O111 IS-P 法プロトタイプの実験
 - 2) O111 IS-P 法プロトタイプによる菌株識別解像度の検証
 - 3) 非特異増幅プライマーの同定
 - 4) O111 IS-P 法プロトタイプからの菌株識別解像度の低いプライマーの除去
 - 5) 206 株における IS629 挿入部位の網羅的抽出
 - 6) 菌株識別解像度向上に向けた新規 IS629 挿入部位の検討
 - 7) O111 IS-P 法プロトタイプからのプライマー選別および改良
 - 8) PCR および泳動条件の再至適化
 - 9) PCR コントロール DNA の実験
 - 10) 協力機関におけるプライマーセットおよびコントロール DNA の検討
 - 11) マイクロチップ電気泳動 MultiNA を用いた機関 B による検討
- の各項目で結果が得られた。詳細は、分担報告書を参照されたい。

鈴木による分担研究では

non-0157 の腸管出血性大腸菌 (EHEC) の迅速・簡易な分子疫学解析法として PCR based ORF typing (POT) 法改良の検討を行った。愛知県衛生研究所保有株および感染症研究所提供株 DNA を使った検討、並びに全国 14 カ所の地方衛生研究所にプライマー、Taq ポリメラーゼ、陽性コントロール DNA を送付し、各地方衛生研究所における保存株を用いた EHEC-POT 法の評価を行った。各血清群における解像度は表 S 1 に示した。

表 S 1 各血清型における菌株識別能力 (同一事例由来株を除く)

血清型	株数	POT 型数	D index
O26	44	36	0.992

O91	31	21	0.968
O103	102	58	0.983
O111	27	26	0.997
O121	58	11	0.702
O145	79	40	0.961
O157	202	66	0.957
O165	35	25	0.978
その他	40	35	0.993

砂川による分担研究では、

- (1) MLVA データと NESID データの連携と統合データの活用に関する検討
- (2) NESID データに基づく広域事例疑いの早期探知に関する検討
- (3) 実際の事例への対応について
- (4) 海外における食中毒調査に関する疫学・病原体情報の連携に関する情報収集

について成果が得られた。詳細は分担報告書を参照されたい。

菌株情報と疫学情報との連携が疑い事例発生初期に難しい現状があったが、感染研に送付される菌株の 77%程度に NESID 番号が付加されるようになったこと、更に付加されない場合においても、本研究で作成した突合プログラムで約 66%において NESID 情報を参照できるような状況になった。

早期探知に関してもアラートレベルを設定し、2019 年において試行したところ、レベル 3 以上の 4 回の事例を見出し、厚生労働省（食品監視安全課及び結核感染症課）への情報提供を実際に行うことが出来た。

D. 考察

O 抗原の多様性からもわかるように腸管出血性大腸菌は多様な菌株集団である。腸管出血性大腸菌感染症の感染源調査、集団事例の原因究明を積み重ねることで、リスク軽減をはかることが重要である。しかしながら、これらの調査を迅速に進めるためには、情報の解析手法を迅速化すること、さらに菌株の同一性を迅速に明らかにすることが重要である。本研究においては、分子型別法の改善・開発と疫学情報の利用法についての開発に着手した。

広域に跨る集団事例の場合においては、それぞれの自治体においては散发例として認識されてしまい、積極的な疫学調査を開始する判断が難しい場合が多い。そのため、全国のデータが集約されている既存の発生動向調査のデータを迅速に処理し、事例の異常集積を把握することを目指した。砂川らの処理手法により 2019 年においては、広域事例の疑いとして厚生労働省への情報提供を 4 回実施し、複数の自治体に対する喫食状況調査等の早期の実施に結びつけることができた。なお、2019 年に用いたアラート閾値 (図 1) は 2018 年実績に基づく暫定的なものである。感度、特異度、発生頻度等のバランスを考慮しつつ、より迅速に探知するための閾値設定の再検討を行う必要がある。また、迅速探知により早められた調査開始を汚染源の同定につなげるための全体のスキームについて、関係機関との調整を含めた検討を行うことも今後の課題である。

多様な腸管出血性大腸菌のそれぞれを的確に、かつ迅速に解析する手法の開発を検討した。各自治体の検査施設のキャパシティに応じて利用できるスクリーニング目的としての迅速解析法を複数開発し、応用可能な状態にすることが重要と考えた。一つには、EHEC O157 用に当初開発された IS-printing (IS-P)法の適用拡大を目指した。EHEC O121, O103, O111 に関して、実用化可能な系の開発に成功した。IS-printing 法はゲノム情報を有効に活用し、迅速な解析手法として開発された経緯がある。系の開発には、試行錯誤が必要であった。しかしながら、本研究において、プロタイプの開発経緯において、ISMMapper を用いた IS 検索の結果を基に、最も解像度の高い標的部位の決定を行うパイプラインを構築できたことは、この研究での重要な技術的側面である。しかし、プロタイプの開発と検証を行う中で、ISMMapper の予測精度に問題があることが判明し、独自に IShunter (仮称) プログラムを開発した。このプログラムを組み込んで改良した IS-P 開発パイプラインは一定の精度を維持したまま大部分の作業をオートメーション化しているため、他の菌での IS-P システムの開発への応用が容易である。また、IShunter プログラムは、IS-P システムの開発だけでなく、他の IS 関連研究にも貢献すると期待される。

さらに、PCR-based ORF typing, POT 法の改良とその検証を行った。O157, O121 を除き多様な血清型の EHEC を EHEC-POT 法を用いてタイプングすることができた。EHEC-POT 法は特定の血清型に特化せず、多くの EHEC 分離株に

適用することができると考えられる。

その一方、O157 及び O121 による分子疫学調査はできないと考えられた。この研究では O157 を対象血清としなかったため菌株識別能の確保が十分に行われていない。O157 に関しては MLVA や IS-printing が普及しているため、新たな手法の必要性は低いと考えられる。O121 についてはきわめて多様性の少ないグループであり、POT 法の原理では十分な菌株識別能を実現することはできないと考えられた。MLVA 等、POT 法以外の手法でタイピングする必要がある。

また高精度の菌株識別能力を持つ MLVA 法の適用を拡大するために、解析部位を増やした MLVA43 法を開発し、実用化が実現している。これらの手法の各自治体での実践的な利用のためには、陽性コントロールの配付、研修、適切な内部精度管理手法の提供が必要である。今後、本研究で遂行された実績を利用して、各自治体での利用を促すことを進めて行くことで、迅速な調査・解析が期待される。

E. 結論

IS-P_O121、IS-P_O111 のプロトタイプの各地の地衛研で検証結果等を基に、問題点の抽出がなされた。IS-P_O121、IS-P_O103 に関しては、開発用パイプラインを改善し、最終的な解析系の開発が完了した。また、IS-P_O103 においても系が確立された。EHEC-POT 法の開発も完了し、O121 と O157 を除くほとんど全ての血清型の EHEC を、実用上問題の無い菌株識別能力で、汎用的に分子疫学解析できることが示唆された。全国の地方衛生研究所で実施可能としていくことで、マイナーな血清型の EHEC 感染症監視に貢献できると期待される。

MLVA43 法および IS-P と POT 法との組み合わせにおいて様々な施設で解析が可能となり、NESID データを用いた広域散発事例の早期探知と組み合わせることで、広域集団事例の発生時にも迅速な対応の準備が完了したと考えられる。今後、これらの解析手法の普及に努めていく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 大西 真、反復配列多型解析 - Multilocus Variable-Number Tandem Repeat 法、食品衛生研究 2019: 69, 7-15.

- (2) 泉谷秀昌、李謙一、伊豫田淳、大西真 : 2018 年に分離された腸管出血性大腸菌の MLVA 法による解析。IASR、第40巻、81-82、2019 年5月

- (3) Lee K, Izumiya H, Iyoda S, Ohnishi M. Effective surveillance using multilocus variable-number tandem-repeat analysis and whole-genome sequencing for enterohemorrhagic Escherichia coli O157. Appl Environ Microbiol 2019. 85. 10.1128/AEM.00728-19

(4)

2. 学会発表

- (1) 松尾真奈、中村佳司、西田留梨子、伊豫田淳、大西真、大岡唯祐、小椋義俊、林哲也 : 腸管出血性大腸菌 O121 用 IS printing の開発に向けた O121 に分布する IS の網羅的探索、第 91 回日本細菌学会総会、2018 年 3 月 27-29 日、福岡
- (2) 鈴木匡弘、土井洋平、荒川宜親 : ORF 保有パターンによるゲノムの系統解析第 91 回日本細菌学会総会 2018 年 3 月 福岡市
- (3) 中村佳司、谷口愛樹、西田留梨子、後藤恭宏、小椋義俊、伊豫田淳、大西真、林哲也、腸管出血性大腸菌 O121 : H19 の乳糖分解性に関する遺伝因子の特定、第 162 回日本獣医学会学術集会、2019 年 9 月 10 日-12 日、筑波。
- (4) 谷口愛樹、中村佳司、西田留梨子、伊豫田淳、大西真、大岡唯祐、小椋義俊、林哲也 : O121:H19 EHEC 用 IS-printing system の開発に向けた IS の網羅的探索と国内分離株での IS 分布状況解析、第 93 回日本細菌学会総会、2020 年 2 月 19~21 日、名古屋
- (5) 中村佳司、谷口愛樹、西田留梨子、後藤恭宏、小椋義俊、林哲也、EHEC O121:H19 の継代培養中に生じる乳糖分解性の変化に関する遺伝的メカニズムの解明、第 93 回日本細菌学会総会、2020 年 2 月 19~21 日、名古屋。
- (6) 谷口愛樹、中村佳司、伊豫田淳、大西真、大岡唯祐、小椋義俊、林哲也 : 腸管出血性大腸菌 O103:H2 における高精度系統解析と完全長配列決定株のゲノム構造比較、第 14 回日本ゲノム微生物学会年会、2020 年 3 月 6~8 日、名古屋

- (7) 大岡唯祐、李謙一、桂啓介、伊豫田淳、藺牟田直子、林哲也、大西真、西順一郎：腸管出血性大腸菌O111用IS-printing systemの開発、第22回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2018年11月8-9日、東京
- (8) 泉谷秀昌、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：2018年における腸管出血性大腸菌のMLVAによる分子疫学解析。第40回日本食品微生物学会学術総会、2019年11月、東京都
- (9) WGS解析によるMLVAの評価と効率的腸管出血性大腸菌 O157 サーベイランス手法の確立、ポスター、李謙一、泉谷秀昌、伊豫田淳、大西真、EHEC Working Group、第92回日本細菌学会総会、2019/4/23、国内

- (10) Whole Genome Sequence-based Surveillance Method and the Comparison with Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis in Enterohemorrhagic Escherichia coli O157、口頭・ポスター、K. Lee、H. Izumiya、S. Iyoda、M. Ohnishi、EHEC Working Group、ASM microbe 2019、2019/6/22

(11)

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

図1 新規開発 MLVA43 (MLVA17+26) と既存法 MLVA17 との比較

2つの MLVA 法で 0103, 0121, 0145, 0165, 091 株を解析し比較した。解析結果は MST 法で描画した。丸がそれぞれの菌株が示す MLVA 型で、同一の MLVA 型の場合は1つの円が分割して表示した。血清群ごとに色分けされている。異なる MLVA 型との関連は、線の太さと長さで示している

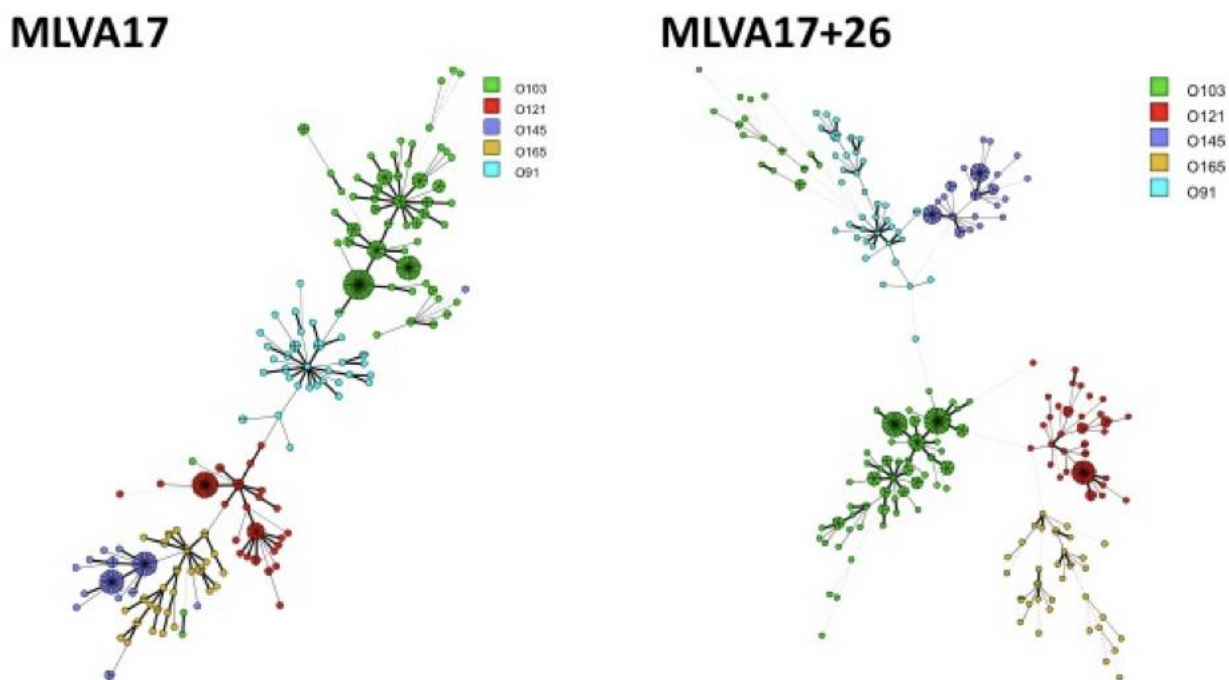


表1 各血清群の MLVA17 および MLVA43 の解像度の比較

	株数	型数		多様性指数	
		MLVA17	MLVA43	MLVA17	MLVA43
0103	159	55	66	0.945	0.959
0121	58	24	34	0.857	0.912
0145	52	14	23	0.787	0.913
0165	37	27	33	0.983	0.994
091	43	33	38	0.982	0.993

食品由来が疑われる有症事案に係る調査(食中毒調査)の迅速化・高度化に関する研究

- 【現状】** 事例調査、原因究明には菌株の分子型別による比較解析が必須。疫学情報との連結する方策が必要
- 【目的】** 迅速な分子型別の実施には、キャパシティを勘案して地方（衛生研究所）と国（感染研）とで0群ごとで実施試験項目を整理し、全体として迅速に事例対応を開始するための情報提供を可能とする。
- 【本課題での目標】** 1. 迅速な分子型別手法の開発 1) IS-P法の対象の拡大、2) POT法の対象の拡大、2. 高精度分子型別手法の開発、3. 分子型別法の結果と疫学情報を統合するシステムの開発

本研究で開発した手法を基盤にした分子型別手法の利用方法の提案

太字が本課題関連

		O157/O26/O111	O103/O121/O145/O165
国	高解像度法	MLVA (既存法)	MLVA【本研究2-1】 利用開始
地方	高解像度法	MLVA (既存法を一部で実施。 【本研究2-1】 で統一化の支援を実施)	MLVA【本研究2-1】の利用を検討する。しかし、少数の菌株の解析では運用コストが高いため要検討
地方	迅速法	IS-P (既存はO157/O26にのみ対応)、POT法	IS-P 【本研究1-1】 O103, O121, O111を対象とした手法の利用 POT法 【本研究1-2】 O121以外での利用

本研究の進捗状況

		H29-H31/R1年度 進捗
IS-P O121 法 IS-P O103 法		ともに、系統解析、新規参照株のデータ取得。プライマリーセットの設計、条件検討を実施した。 IS-P O121 法 19の地方衛生研究所に配布し検証。 新たなIS検索プログラムを開発し、解析パイプラインを再構築 IS-P O103 法 IS-P O121法の検証結果に基づいて、同様に新規解析パイプラインで改善を施した。
IS-P O26法 (計画外の追加プロジェクト)		既存法の改善を試行したが、上記の開発を進行させるため断念した。

食品由来が疑われる有症事案に係る調査(食中毒調査)の迅速化・高度化に関する研究

【現状】事例調査、原因究明には菌株の分子型別による比較解析が必須。疫学情報との連結する方策が必要

【目的】迅速な分子型別の実施には、キャパシティを勘案して地方(衛生研究所)と国(感染研)とで0群ごとで実施試験項目を整理し、全体として迅速に事例対応を開始するための情報提供を可能とする。

【本課題での目標】1. 迅速な分子型別手法の開発 1) IS-P法の対象の拡大、2) POT法の対象の拡大、2. 高精度分子型別手法の開発、3. 分子型別法の結果と疫学情報を統合するシステムの開発

本研究で開発した手法を基盤にした分子型別手法の利用方法の提案

太字が本課題関連

		O157/O26/O111	O103/O121/O145/O165
国	高解像度法	MLVA (既存法)	MLVA【本研究2-1】 利用開始
地方	高解像度法	MLVA (既存法を一部で実施。 【本研究2-1】 で統一化の支援を実施)	MLVA【本研究2-1】の利用を検討する。しかし、少数の菌株の解析では運用コストが高いため要検討
地方	迅速法	IS-P (既存はO157/O26にのみ対応)、POT法	IS-P 【本研究1-1】 O103, O121, O111を対象とした手法の利用 POT法 【本研究1-2】 O121以外での利用

本研究の進捗状況

		H29-H31/R1年度 進捗
IS-P O121 法		ともに、系統解析、新規参照株のデータ取得。プライマーセットの設計、条件検討を実施した。 IS-P O121法 19の地方衛生研究所に配布し検証。 新たなIS検索プログラムを開発し、解析パイプラインを再構築 IS-P O103法 IS-P O121法の検証結果に基づいて、同様に新規解析パイプラインで改善を施した。
IS-P O103法		
IS-P O26法 (計画外の追加プロジェクト)		

食品由来が疑われる有症事案に係る調査(食中毒調査)の迅速化・高度化に関する研究

【現状】 事例調査、原因究明には菌株の分子型別による比較解析が必須。疫学情報との連結する方策が必要

【目的】 迅速な分子型別の実施には、キャパシティを勘案して地方（衛生研究所）と国（感染研）とで0群ごとで実施試験項目を整理し、全体として迅速に事例対応を開始するための情報提供を可能とする。

【本課題での目標】 1. 迅速な分子型別手法の開発 1) IS-P法の対象の拡大、2) POT法の対象の拡大、2. 高精度分子型別手法の開発、3. 分子型別法の結果と疫学情報を統合するシステムの開発

本研究で開発した手法を基盤にした分子型別手法の利用方法の提案

太字が本課題関連

		O157/O26/O111	O103/O121/O145/O165
国	高解像度法	MLVA (既存法)	MLVA【本研究2-1】 利用開始
地方	高解像度法	MLVA (既存法を一部で実施。 【本研究2-1】 で統一化の支援を実施)	MLVA【本研究2-1】の利用を検討する。しかし、少数の菌株の解析では運用コストが高いため要検討
地方	迅速法	IS-P (既存はO157/O26にのみ対応)、POT法	IS-P 【本研究1-1】 O103, O121, O111を対象とした手法の利用 POT法 【本研究1-2】 O121以外での利用

本研究の進捗状況

		H29-H31/R1年度 進捗
IS-P O121 法 IS-P O103法		ともに、系統解析、新規参照株のデータ取得。プライマーセットの設計、条件検討を実施した。 IS-P O121法 19の地方衛生研究所に配布し検証。 新たなIS検索プログラムを開発し、解析パイプラインを再構築 IS-P O103法 IS-P O121法の検証結果に基づいて、同様に新規解析パイプラインで改善を施した。
IS-P O26法 (計画外の追加プロジェクト)		既存法の改善を試行したが、上記の開発を進行させるため断念した。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
平成 29 年度-令和元年度 分担研究報告書

食品由来が疑われる有症事案に係る調査（食中毒調査）の迅速化・高度化に関する研究
分担課題 EHEC O103, O121 に対する IS-P 法の開発に関する研究

研究分担者 林 哲也（九州大学・大学院医学研究院・教授）

研究要旨

IS-printing (IS-P) 法は、我々が独自にゲノム情報を利用して開発した迅速かつ簡便な菌株識別手法である。本法は、施設間での比較が容易なデータを迅速に得られるため、スクリーニング法として各地の地方衛生研究所（地衛研）で広く使用されている。しかし、O157 と O26 のみに適用可能であったため、本研究では、O121 用及び O103 用の IS-P 法（IS-P_O121 と IS-P_O103）の開発を行った。まず、近年の分離株のゲノム配列を取得し、全ゲノム SNP を用いた高精度系統解析により各血清型の集団構造を明らかにし、主要系統などを同定した。また、参照ゲノムの解析から主要 IS を同定し、標的 IS として決定した（O121 では IS600 と IS629、O103 では IS629）。さらに、最も解像度の高い標的部位を効率的に選抜できる開発パイプラインを構築し、これを用いて IS-P_O121 の標的部位を決定し、プロトタイプを作成した。この IS-P_O121 プロトタイプを各地の地衛研に配布して現場での試用を行い、その結果等を踏まえて、開発パイプラインを改良した（IS 挿入状況を高精度に判定することのできるプログラムの新規開発を含む）。最終的には、分離解像度を向上するために、プロトタイプでの 15 部位を標的とする 1 チューブのマルチプレックス PCR システムから、26 部位を標的とする 2 チューブのマルチプレックス PCR のシステムに変更し、改良した解析パイプラインによってそれぞれ 26 箇所の標的部位を選定した。プライマーセットの作成等は終了し、最終的な反応条件等の最適化と陽性コントロールの追加作成の作業が残っているが、当初の目的である IS-P_O121 と IS-P_O103 がほぼ完成できたといえる。

A. 研究目的

EHEC 感染症の事例調査のために各種の分子型別法が開発され、目的に応じて複数の方法が組み合わせて利用されている。IS-printing (IS-P) 法は、我々の研究室が独自に開発したゲノム情報を利用した簡便な菌株識別手法である。本法は、解像度は低いものの極めて迅速に施設間等での比較が容易なデータが得られるため、スクリーニング法として各地の地方衛生研究所（地衛研）で広く使用されている。また、MLVA 法との組み合わせによって、より高精度な分子型別が可能である。しかし、O157 と O26 のみに IS-P 法は適用可能であったため、対象を拡大することが望まれていた。そこで本分担研究では、O157 用と O26 用 IS-P 法の開発経験を活かして、EHEC O121 用および EHEC O103 用の IS-P 法（以下、IS-P_O121 と IS-P_O103）の開発を行った。

B. 研究方法

1. ゲノム情報の取得

国立感染症研究所（感染研）から O103 と O121

分離株の供与を受け、ゲノム情報を取得した。ゲノム配列の決定には、イルミナシーケンサと Platanus アッセンブラを用いた。クオリティ検定は、scaffold の総長(>5 Mb)と CheckM 解析による completeness (>95%) に基づいて行った。完全長配列の決定には、ナノポア社の MinION を用いた long read sequencing と Unicycler を用いたイルミナ配列との hybrid assembly を使用した。

2. 系統解析

各血清型で完全長配列が決定されている株の配列を参照配列として、各株において全ゲノムレベルで SNP を同定した。この情報を基に RAxML を用いて最尤法による高精度系統解析を行った。

3. IS 検索と標的 IS の決定

IS-P 標的候補の検索を行うため、両血清型の参照ゲノムに含まれる IS の種類、コピー数、ゲノム挿入部位を、ISFinder による検索とその検索結果の個別解析により決定した。また、上記で取得したゲノム情報と ISMapper を使って、主要 IS の各菌株での分布を解析するとともに、参照ゲノムには

存在しない IS 挿入部位を検索した。

4. 標的部位の選定と開発パイプラインの構築

ISMMapper を用いて O121 の参照ゲノムと解析対象株 83 株の解析を行い、ISMMapper による IS 検出の精度と *in silico* での解像度を検討した。また、ISMMapper の予測結果に基づいて最も解像度の高い組み合わせを選択できる開発パイプラインを構築した。

5. IS-P O121 プロトタイプ作成と検証と検証及び開発パイプライン等の改良

上記の開発パイプラインを利用して、IS-P_O121 のプロトタイプを構築し、プライマーセット、プロトコル、陽性コントロールを作成した。酵素、プライマー濃度等に関する至適条件の検討を行った後、19 の地衛研に配布し、実際の菌株を対象とした検証を依頼した。その結果を基に、開発パイプラインの改良 (IS 挿入状況解析プログラムの新規開発を含む) や標的部位数の変更含む種々の改良作業を行なった。

6. IS-P O121 と IS-P O103 最終版の作成

IS-P_O121 プロトタイプの検証結果と開発パイプラインの変更等を踏まえて、標的部位の数の変更と解像度検定用菌株の変更を行った。そのうえで、改良した開発パイプラインを用いて IS-P_O121 と IS-P_O103 の最終版を作成した。

(倫理面への配慮)

本分担研究では、分離菌株とそのゲノム情報のみを扱うため、特別な倫理面での配慮は必要としない。

C. 研究結果

1. ゲノム情報の取得と系統解析

(1) 本研究開始時点では、O121 のゲノム情報は我々と感染研の共同研究によって蓄積できていたが (76 株)、O103 のゲノム情報は蓄積できていなかった。そこで、感染研が収集した EHEC 分離株の中から約 100 株の O103 を選択し (2007~2017 年の国内分離株、2014 年以降が中心)、その中から、開発基盤となる 73 株のゲノム情報を取得した。また、29 株の O103 を各地の地衛研から収集し、ゲノム配列を取得した。本データは、最終的な IS-P データの検証用に使用する予定である。O121 についても、本研究では最近の分離株のゲノム情報が使うべきであると判断し、近年分離された 85 株 (2011~2016 年の分離株) のゲノム情報を取得した。

(2) 解析の基準となる株の完全長配列 (参照ゲノム) に関しては、O103 については 2009 年に我々が決定しており、O121 についても未発表ではあるが既に我々が決定していた (O121 51104 株: 西

田、他、未発表)。しかし、次項に記載する高精度系統解析の結果から、O103 における IS 検索には複数の系統の完全長配列が必要と判断し、主要 3 系統から 1 株ずつを選択し、1 完全長配列を新たに決定した。

2. 系統解析

IS-P 標的候補の検索等を行う前段階として、菌株の偏り (特定の亜系統への集中など) の有無を検討するために、全ゲノム配列に基づく高精度系統解析を行った。

(1) O121 については、ゲノム配列を取得した 85 株のうち、配列精度に問題のあった 2 株を除く 83 株の全ゲノム SNP を用いた系統解析の結果、83 株が大きく 2 つの系統に分かれることが判明した。主系統には 79 株が含まれ、マイナー系統には 4 株が含まれたが、どちらの系統の中にも地理的な偏り (分離地域の偏り) がないことを確認した。

(2) O103 についても、73 株の全ゲノム SNP を用いた系統解析を行った結果、複数の系統が存在すること、また以前に我々が完全長配列を決定した株 (参照ゲノム株) は、マイナー系統に属することが判明した。この結果に対応するため、前項に記載したように、主要な 3 系統から 1 株ずつを選択し、完全長配列を取得した。

3. IS 検索と標的 IS の決定

(1) O121 については、参照ゲノムの解析から、21 種類 (111 コピー) の IS を同定し、IS600 と IS629 が主要な IS であることが判明した (28 コピーと 21 コピー)。このうち、プロフェージとプロフェージ様 Integrative element 及びプラスミドに挿入されているものは、それぞれ 24 コピーと 15 コピーであった。また、今回同定した 21 種類の IS のうち 4 種類 (ISO121-1~ISO121-4) は、既知の IS と 95% 以下の相同性を示すため、新規の IS であると考えられた。以上の解析から、O121 では IS600 と IS629 を標的 IS として決定した。

(2) O103 については、参照ゲノムの解析から、27 種類 (93 コピー) の IS を同定し、IS629 が主要な IS であることを明らかにした (31 コピー)。このうち、プラスミドに挿入されているものは、それぞれ 9 コピーであった。また、今回同定した 27 種類の IS のうち 2 種類 (ISO103-1 と ISO103-2) は、新規の IS であると考えられる。この結果から、O103 では IS629 を標的 IS とすることとした。新たに完全長配列を取得した 3 株についても、ISFinder を用いて IS の種類、コピー数、ゲノム挿入部位を検討し、IS629 が主要 IS であることを確認した。

4. 標的部位の選定と開発パイプラインの構築

(1) O121 の参照ゲノムの ISMapper を用いた解析では、参照ゲノム上に存在する 28 コピーの IS600 のうち、7 コピーは近傍に繰り返し配列等が存在するに検出できなかったが、21 コピーは ISMapper で検出でき、十分な精度があると判断した。さらに、ISMapper を用いた 83 株の検索により、IS600 の分布状況によって 83 株は 65 パターンに型別され、参照配列上に存在しない 6 箇所の IS600 挿入部位も同定された。IS629 に関する同様の解析でも、参照ゲノム上に存在する 21 コピーのうち 18 コピーが ISMapper で検出でき、IS629 の分布状況によって 83 株は 74 パターンに型別され、参照配列上に存在しない 5 箇所の挿入の存在も同定された。さらに、IS600 と IS629 の分布状況を合わせて用いると、83 株が 79 パターンに分類された。

これらの結果から、IS-P_O121 と IS-P_O103 の開発においては、ISMapper の予測結果を基に、標的部位の選定をすすめることとした。なお、83 株の O121 のうち、マイナー系統に属する 4 株には IS600 と IS629 は少数のコピーしか存在しないことが明らかとなり、IS-P_O121 の対象としては考慮しないこととした。

(2) O121 の主系統に属する 79 株における ISMapper を用いた IS600 と IS629 の分布・局在情報を基に、挿入部位近傍の配列を解析し、近傍に IS の存在する IS コピーを同定した。これらを標的候補部位から除外した後、IS600 と IS629 挿入部位を上流下流に分けて 4 セットの IS 挿入部位データセットを作成した。さらに、各セットのクラスタリング解析を行い、最も解像度の高い組み合わせを選択できる開発パイプラインを構築した。

5. IS-P_O121 プロトタイプの作成と検証及び開発パイプライン等の改良

(1) O121 と O103 の IS-P 法としては、15 部位を標的とする 1 チューブのマルチプレックス PCR のシステムとすることに決定した。

(2) O121 において、上記のパイプラインを用いて、15 箇所の IS600 または IS629 の挿入部位を標的部位として決定した。この際、プラスミド及び同じプロフェージ（別研究の解析で保存性が高いことが判明している Stx2 フェージを除く）からはできる限り 1 箇所のみを選択することにより、プラスミドやプロフェージの脱落による影響を抑える工夫をした。

(3) 決定した 15 箇所の標的部位を標的としたマルチプレックス PCR 用のプライマーを作成し、使用する酵素の種類やプライマー濃度等に関して条件検討を行い、PCR 条件の最適化を行った。

(4) 上記の 15 標的部位が 1 株のゲノム上には存

在しないため、特定の株を陽性コントロールとして使用することができないことが判明した。そこで、標的となる 15 領域を pUC プラスミドにクローニングし、配布用陽性コントロールを作成した。

(5) IS-P_O121 プロトタイプ（15 箇所の IS-P 標的部位に対するプライマーセット、プロトコル、陽性コントロール）を、近年 O121 が分離された地衛研に配布し、実際の現場での検証を依頼した。19 の地衛研から協力を得られ、97 事例（154 株）の結果を得ることができた。その結果およびプロトタイプの作成に使用した 79 株を使った実際の PCR の解析から、以下の知見が得られた。

i) 判定ができなかった事例：

5 事例（7 株）ではバンドが得られなかった。これまでの解析で、O121 のマイナー系統に属する株には IS600 と IS629 が存在しないことから、これらの株はマイナー系統に属する可能性が高いと判断した。

ii) 集団感染事例における検証結果：残りの 92 事例のうち、31 事例が集団感染事例であり、そのうち 16 事例については事例内でバンドパターンが一致した。残りの事例では同一事例内でバンドパターンが一致せず、特に 7 事例では、15 箇所の標的部位のうち特定の 1 箇所の判定結果が異なることが不一致の原因であった。この部位については、培養中に挿入されている IS が脱落することが我々の別研究で確認され、IS-P の標的部位としては不適切と判定した。

iii) 解像度：各地衛研で解析された 92 事例での IS-P による分離パターンは 62 パターンであり、想定よりもやや低い分離解像度であった。また、IS-P_O121 のプロトタイプの作成に使用した 79 株から抽出した DNA を使って実際の PCR で判定を行い、標的部の選定に利用した ISMapper の結果と比較したところ、結果が異なる挿入部位を多数認め、ISMapper の判定精度に問題があることが判明した。

iv) 泳動結果の判定：非特異バンドのためにバンドパターンの判定で問題が生じた例が多数報告された。これは、IS-P_O121 では IS600 と IS629 を 1 チューブで同時に反応させていることが影響していると考えられた。また、バンドが非常に薄くなる標的部位があることや、バンドの間隔が狭いために判定が難しく例も確認された。

(6) ISMapper の判定精度には問題があることが判明したため、類似のプログラムである ISseeker を用いてみたが、ISMapper と同様かそれ以下の結果であった。そこで、東京工業大・伊藤研究室と共同で、新たな IS 挿入状況解析プログラムとして IShunter（仮称）を開発した。ISMapper、IShunter、PCR の結果を比較して精度評価を行ったところ、

IShunter は ISMapper と比べて偽陽性・偽陰性判定が少なく、IS-P 開発に適していることが確認できたため、標的部位選定に使用するプログラムを IShunter に変更した。また、これに応じて開発パイプラインを変更した

(7) O103 についても、ISMapper を使った開発パイプラインを用いて、15 箇所 の IS-P 標的部位を決定し、IS-P_O121 プロトタイプと同様の IS-P_O121 プロトタイプを作成した（プライマーと陽性コントロールの作成、反応条件の至適化）。しかし、IS-P_O121 プロトタイプの検証から上記のような問題点が浮かび上がり、種々の改善を行う必要が明らかとなったため、プロトタイプの検証作業は中止し、最終版の作成に進むこととした。

6. IS-P_O121 と IS-P_O103 最終版の作成

(1) IS-P_O121 プロトタイプの検証結果と開発パイプラインの変更を踏まえて、O121 において、改めて 15 箇所 の挿入部位を選定したところ、十分な分離解像度を得ることができないことが判明した。そこで、分離解像度を向上させるために標的部位の数を増やすこととした。また、プロトタイプ検証で明らかとなった非特異バンドの出現やバンド間隔の狭さの問題点も踏まえて、IS-P_O121 では IS600 と IS629 の標的部位をそれぞれ 13 箇所ずつ選定し、別々のチューブで反応を行うことに変更した。IS-P_O103 についても、IS629 の標的部位を 26 箇所選定し、2 チューブで 13 箇所ずつを解析するように変更した。

(2) O121 については主要系統に含まれる 79 株、O103 については 73 株を使用して IS-P システムの開発を進めていたが、系統解析の結果から、SNP 距離が非常に小さい株（非常に近縁の株）が複数含まれていることが判明した。これらの株では IS の挿入状況も類似していると推定されるため、解像度の判定に影響を及ぼす。そこで、SNP 距離が 10 以下となる株をクラスタリングし、同一クラスターから一株だけを代表株として使用することとした。その結果、O121 では 61 株を、O103 では 63 株を検定に使用することとした。

(3) IS-P_O121 最終版の開発に関しては、改良した開発用パイプラインを用いて、IS600 の 13 箇所 と IS629 の 13 箇所を選定した。選定した挿入部位を使用すると、*in silico* の検定では、61 株を 54 パターンに分離できる。選定した標的部位について、それぞれ 1 チューブずつで判定するマルチプレックス PCR 用のプライマーセットを作成した。作成したプライマーミックスを用いて実サンプルを用いたマルチプレックス PCR を実施し、バンドの増幅具合やバンド間隔などを検討した。その結果をもとに、さらにプライマーの変更を行い、最終版を作成した。現在、変更したプライマーに対す

る陽性コントロールの作成のみを残す状況となっている。

(4) IS-P_O103 最終版の開発に関しても、改良した開発用パイプラインを用いて、IS629 の 26 箇所を選定した。選定した挿入部位について、13 箇所ずつ判定を行う 2 チューブでのマルチプレックス PCR 用のプライマーセットを作成した。作成したプライマーミックスを用いて実サンプルを用いたマルチプレックス PCR を実施し、バンドの増幅具合やバンド間隔などを確認したところ、26 箇所のうち 2 箇所が判定には不適であることが判明した。そこで改めて他の挿入部位から 2 箇所を選定し直し、最終的なプライマーセットを作成した。このセットの *in silico* の検定では、63 株を 41 パターンに分離できる。現在、変更した標的部位に対する陽性コントロールの作成のみを残す状況になっている。

D. 考察

O121 のゲノム情報の取得に関しては、先行研究で取得済みであった国内分離株の分離年が古く、本研究では最近の分離株のゲノム情報が使わなければならないと判断し、当初予定を変更し、2011～2016 年の分離株 85 株のゲノム情報を取得した。O103 についても 102 株の情報を取得でき、さらに 3 株については完全長配列を決定した。これらのゲノム情報、また、取得したゲノム情報を用いた高精度系統解析から明らかになった両血清型の集団構造は、IS-P 法の開発にとって重要な知見であるが、O121 と O103 に関する様々な研究を進める上でも、重要な情報基盤となる。特に、O121 において主系統と異なる系統が見出されたことは、予想外の発見である。このマイナー系統に属する株は、IS600 と IS629 は検出できず、主要系統との遺伝的距離も、O157:H7 と O55:H7 との距離とほぼ同じレベルであることから、メジャー系統とは系統的に大きく離れた O121 系統であると考えられる。この系統の O121 株にも志賀毒素遺伝子やその他の EHEC 病原遺伝子が存在することは確認している。従って、この系統は IS600 と IS629 を用いた IS-P 法の適応外となるが、有症患者から分離されていることから、今後の分離動向については注意が必要である。

両血清型の参照株における IS の詳細な解析から、O121 では IS600 と IS629 が、O103 では IS629 が主要な IS であることを明らかとなり、この結果を基に、これらの IS を IS-P_O121 と IS-P_103 の標的 IS としたが、この解析から得られた IS に関する知見も、6 種類の新規 IS を同定したことを含め、細菌学的には重要な研究成果である。

プロタイプの作成を行う中で、ISMMapper を用いた IS 検索の結果を基に、最も解像度の高い標的部位の決定を行うパイプラインを構築できたことは、この研究での重要な技術的側面である。しかし、プロタイプの開発と検証を行う中で、ISMMapper の予測精度に問題があることが判明し、独自に IShunter (仮称) プログラムを開発した。このプログラムを組み込んで改良した IS-P 開発パイプラインは一定の精度を維持したまま大部分の作業をオートメーション化しているため、他の菌での IS-P システムの開発への応用が容易である。また、IShunter プログラムは、IS-P システムの開発だけでなく、他の IS 関連研究にも貢献すると期待される。

プロタイプの検証結果等を受けて、当初に決定した方針 (15 部位を標的とする 1 チューブのマルチプレックス PCR の作成) を変更し、最終的な IS-P としては、26 部位を標的とした 2 チューブの解析系とした。現場での作業の煩雑性やコストを考えると 1 チューブのシステムの方が良いことは確かである。しかし、解像度の問題を考慮すると、この変更は妥当ではあると考えている。

重症合併症を併発する EHEC 食中毒では、集団感染事例を迅速に検出し、原因や感染経路を特定することが重要であるが、原因や感染経路等が判明しないケースも多い。本研究で作成した IS-P_O103 や IS-P_O121 は、他の分子疫学解析手法や疫学情報と効果的に統合することによって、国内で相当数の患者発生があるにもかかわらず迅速型別手法が開発されていない O103 EHEC と O121 EHEC による食中毒調査の迅速化、高度化、効率化に貢献でき、結果として、より多くのケースで原因を明らかにすることで、より適切な食品の取り扱い方法の提案、問題点の抽出が可能となり、より安全な食品の提供につながると期待される。また、本研究の開発戦略は、他の EHEC や腸管病原菌に対する対策や効率的調査法の開発にも利用できると思われる。

E. 結論

O121 に関しては、2011~2016 年に分離された 83 株のゲノム配列を取得し、全ゲノム SNP を用いた高精度系統解析を行った結果、これまでに報告のない新規の O121 亜系統を同定した。また、参照ゲノムの解析から、IS600 と IS629 が主要な IS であることを明らかにし、この 2 つを標的として決定した。O103 に関しては、2007~2017 年の国内分離株 102 株のゲノム情報を取得し、3 株については完全長配列を決定した。参照ゲノムの解析では、IS629 が主要な IS であることを明ら

かにし、これを標的 IS とすることとした。

IS 挿入部位検索プログラムを用いた IS 検索の結果に基づいて最も解像度の高い標的部位の決定を行う開発パイプラインを構築し、これを用いて、IS-P_O121 プロトタイプを作成し、各地の地衛研で検証を行った。この結果等を基に、開発用パイプラインを改善し (独自の IS 挿入部位検索プログラムの開発を含む)、これを用いて最終的な IS-P システムを作成した。作成した IS-P_O121 と IS-P_O103 は、いずれも、26 部位を標的とした 2 チューブのマルチプレックス PCR である。現在、一部の陽性コントロールの作成が残っているが、作成が完了次第、各地の地衛研へ配布できる状況となり、本開発研究の目標である IS-P_O121 と IS-P_O103 はほぼ完成できたといえる。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 松尾真奈、中村佳司、西田留梨子、伊豫田淳、大西真、大岡唯祐、小椋義俊、林哲也：腸管出血性大腸菌 O121 用 IS printing の開発に向けた O121 に分布する IS の網羅的検索、第 91 回日本細菌学会総会、2018 年 3 月 27-29 日、福岡

2) 谷口愛樹、中村佳司、西田留梨子、伊豫田淳、大西真、大岡唯祐、小椋義俊、林哲也：腸管出血性大腸菌 O121 用 IS-printing system の開発を見据えた O121 に分布する IS の網羅的探索と国内分離株における分布状況の調査、腸管出血性大腸菌研究会、2018 年 11 月 8~9 日、東京

3) 腸管出血性大腸菌 O121 : H19 の乳糖分解性に関与する遺伝因子の特定、中村佳司、谷口愛樹、西田留梨子、後藤恭宏、小椋義俊、伊豫田淳、大西真、林哲也、第 162 回日本獣医学会学術集会、2019 年 9 月 10 日-12 日、筑波。

4) 谷口愛樹、中村佳司、西田留梨子、伊豫田淳、大西真、大岡唯祐、小椋義俊、林哲也：O121:H19 EHEC 用 IS-printing system の開発に向けた IS の網羅的探索と国内分離株での IS 分布状況解析、第 93 回日本細菌学会総会、2020 年 2 月 19~21 日、名古屋

5) EHEC O121:H19 の継代培養中に生じる乳糖分解性の変化に関わる遺伝的メカニズムの解明、中村佳司、谷口愛樹、西田留梨子、後藤恭宏、小椋義俊、林哲也、第 93 回日本細菌学会総会、2020

年 2 月 19～21 日、名古屋.

6) 谷口愛樹、中村佳司、伊豫田淳、大西真、大岡唯祐、小椋義俊、林哲也：腸管出血性大腸菌 O103:H2 における高精度系統解析と完全長配列決定株のゲノム構造比較、第 14 回日本ゲノム微生物学会年会, 2020 年 3 月 6～8 日、名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
平成 29-令和元年度 分担研究報告書食品由来が疑われる有症事案に係る調査（食中毒調査）の迅速化・高度化に関する研究
分担課題 腸管出血性大腸菌 O111 に対する IS-printing 法の開発に関する研究研究分担者 大岡 唯祐（鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・微生物学・講師）
研究協力者 磯部 順子（富山県衛生研究所・上席専門員）
木全 恵子（富山県衛生研究所・副主幹研究員）
原田 哲也（大阪健康安全基盤研究所・主任研究員）
若林 友騎（大阪健康安全基盤研究所・研究員）
西嶋 駿弥（大阪健康安全基盤研究所・研究員）
江藤 良樹（福岡県保健環境研究所・専門研究員）

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は、溶血性尿毒症症候群や脳症などの重症合併症を発症するリスクの高い感染症であり、多数の集団感染事例を含めて毎年 3,500-4,000 例の報告されている。これまで様々な行政対応がなされてきたものの、原因や感染経路等が判明しないケースも多数存在する。毎年報告される血清型は O157 が中心であり、次いで O26, O103, O111 などの報告数が多いが、それ以外の血清型も増加している。我々はこれまでに EHEC O157 ゲノムにおいて挿入配列 IS629 の局在が株間で多様である点を利用し、簡便迅速菌株識別システムとして、検査現場での利用も可能な O157 IS-printing 法を開発してきた。本研究では、そのシステムを応用して、EHEC O111 について IS-printing 法（O111 IS-P 法）を開発することを目指した。参照株である 11128 株の IS629 挿入部位を標的として O111 IS-P 法プロトタイプを作製し、600 株のドラフトゲノムデータを基に改良して最終的なプライマーセット（FS, RS ver.2 の 2 セット）を構築した。また、各標的領域の PCR 産物をプラスミドへクローニングし、PCR の陽性コントロール DNA として作製した。協力機関において、分離株および集団感染事例由来株を用いた検討を実施し、検査現場での実用化に向けた改良を行った。

A. 研究目的

生死に関わる重症合併症を発症するリスクの高い EHEC による食中毒調査において、様々な集団感染事例を特定し、その原因を明確にすることで、様々な衛生規範、基準の作成、改訂につながってきた。しかしながら、EHEC 感染症の報告数は 3,500-4,000 例と依然として多数にのぼり、血清型も O157 が中心となるものの、O26, O103, O111 などの報告数も多く、また近年それ以外の血清型も増加しており、原因や感染経路等が判明しないケースが多数ある。EHEC 感染症の事例調査のために、これまで各種分子型別法が開発され、複数の方法を組み合わせて目的に応じて使い分けているが、中でも、解像度は低いものの極めて迅速に比較的容易なデータが得られるスクリーニング法である IS-printing 法（IS-P 法）と多検体処理が容易な高解像度解析法である MLVA 法との組み合わせが最も効果的とされて

いる。しかしながら、IS-P 法は O157 と O26 のみに適用可能であり、分離頻度の比較的高い O111 や O103 についてはまだ存在しない。

本研究では、O111 について、菌株識別解像度の高い IS-P 法を開発し、臨床検査の現場で安定した結果が得られるように反応系の最適化を行うことを最終目標とする。

B. 研究方法

完全長配列が決定している O111:H- 11128 株のゲノム情報および平成 27-29 年度 感染症実用化研究事業「ゲノム解析に資する下痢原性細菌感染症サーベイランスの強化及びゲノム解析を利用した迅速診断法の開発に向けた研究（感染研・伊豫田淳代表）」で取得された O111 約 600 株のドラフトゲノム情報（イルミナ MiSeq データ）を利用し、以下の流れで行った。

1) O111:H- 11128 株の IS629 挿入部位（30 か所）

を標的とした O111 IS-P 法プロトタイプ作製

完全長配列が決定している O111:H- 11128 株に関しては、IS629 挿入部位約 30 か所が既に同定されている。この株の IS 挿入部位を標的とし、O111 IS-P 法のプロトタイプを作製した。まず、IS629 の内部に共通な外向きの IS 内部プライマーを設計し、次に、各 IS 挿入部位の近傍領域に IS 内部プライマーと対をなす外側プライマーを設計した。その際、プライマー間の距離は 100 bp から 1 kbp の範囲内で、さらに標的ごとに PCR 増幅サイズが異なるように設計した (図 1)。この方法により O111 IS-P 法プロトタイプ (FS1-3, RS1-3 の 6 プライマーセット) を構築した。PCR には KOD-Multi&EPI (東洋紡) を用い、PCR 反応液の組成は計 15 μ l (template DNA 1 μ l、外部プライマーミックス[各 4.5 μ M] 1 μ l、IS629 内部プライマー[25 μ M] 1 μ l、2 x PCR buffer 7.5 μ l、MilliQ 水 4.2 μ l、KOD-Multi&EPI 酵素 0.3 μ l)、PCR プログラムは 94°C 2min、30 サイクル (98°C 10 秒、58°C 30 秒、68°C 1 分)、電気泳動は 2% Agarose S (ニッポンジーン) in 0.5 x TBE バッファーを用い、PCR 反応液 1 μ l を泳動するという条件で実施した。

- 2) 全ゲノム系統樹を用いた O111 IS-P 法のための多様性解析株の選定および O111 IS-P 法プロトタイプによる菌株識別解像度の検証

O111 約 600 株のドラフトゲノム情報 (イルミナ MiSeq データ) を基に高精度系統解析を行い、その中から系統の離れた 206 株を選定して実施した。得られた PCR 増幅バンドの有無 (有りを「1」、無しを「0」) をデジタル化し、Cluster ソフトを用いてバンド情報を基にしたデンドログラムを作成した。

- 3) 非特異増幅プライマーの同定

項目 2) で実施した PCR 結果判定に際し、目的サイズと明らかに異なるバンドが検出される株があった場合、各プライマーセットに含まれる外側プライマーの個別 PCR を行って、どのプライマーに由来する非特異増幅バンドかを同定した。

- 4) O111 IS-P 法プロトタイプからの菌株識別解像度の低いプライマーの除去

O111 IS-P 法プロトタイプからの菌株識別解像度向上ならびに検査現場で対応可能なプライマーセット (2 プライマーセット) の最終構築のため、まず、プロトタイプにおいて識別解像度が低い IS629 挿入部位の同定を

試みた。項目 1) の解析結果から、PCR 陽性が①5 株未満、②180-190 株、③190 株以上という基準で該当領域を抽出し、必要に応じて該当プライマーを除去した。

- 5) 206 株の MiSeq データからの IS629 配列の網羅的抽出と IS629 挿入部位の推定

解析対象株 206 株の MiSeq リード配列に対して、挿入配列 IS629 を含むリードを blastn により検索した。そのうち、MiSeq ペアリードの一方のみ挿入配列 IS629 を含むリードを選別し、対となるリード配列を網羅的に抽出した。完全長配列が決定している O111:H-11128 株のゲノム配列を参照配列として、抽出した MiSeq リード配列を Burrows-Wheeler Alignment Tool (BWA) を用いてマッピングし、各株における IS629 の挿入部位を推定した (図 2)。

- 6) 菌株識別解像度向上に向けた新規 IS629 挿入部位の選定および挿入部位の詳細な配列解析

206 株のドラフトゲノム情報から新たに同定した IS629 挿入部位の中で、菌株識別解像度が低い系統を中心に解像度向上が見込まれる標的部位を選定した。推定 IS 挿入部位の前後 1 kbp 付近の配列を得られるように外部プライマーを設計し、IS 内部プライマーとの PCR およびシーケンシングにより配列を決定した。

- 7) O111 IS-P 法プロトタイプからのプライマー選別および改良

206 株を用いてプロトタイプの検定を行い、菌株識別解像度が高くなる標的領域を選定した FS, RS ver.1 (標的部位、計 24 か所) について、2 セットにすることで下がった菌株識別解像度を上げるため、項目 6) で選定した IS 挿入部位を標的部位としたプライマーを FS, RS プライマーセット (ver.2) に新たに追加した。

- 8) PCR および泳動条件の再至適化

PCR には KOD-Multi&EPI (東洋紡) を用い、PCR 反応液の組成は計 15 μ l (鋳型 DNA 1 μ l、外部プライマーミックス[各 5 μ M] 0.75 μ l、IS629 内部プライマー[50 μ M] 0.75 μ l、2 x PCR buffer 7.5 μ l、MilliQ 水 4.7 μ l、KOD-Multi&EPI 酵素 0.3 μ l)、PCR プログラムは 94°C 2min、30 サイクル (98°C 10 秒、58°C 30 秒、68°C 1 分) で PCR 機器として Biometra 社の T-professional を用いて行った。菌株からの

鋳型 DNA 調整は、アルカリボイル法を用いた。電気泳動は 1.5-3.0 % の濃度で Agarose S (ニッポンジーン) in 0.5 x TBE バッファーおよび NuSieve™ 3:1 アガロース in 0.5 x TBE バッファーを用い泳動機器として MyRun を使用し、PCR 反応液 1 µl を泳動するという条件で実施した。

9) PCR コントロール DNA の作製

項目 7) で作製した ver.2 プライマーセットに用いた各標的領域 (計 24 領域) について、各標的部位の外部プライマーと IS629 内部プライマーを用いて KOD-Multi&EPI 酵素で PCR 増幅し、PCR purification kit (Qiagen) で精製した。DNA Ligation Kit (Mighty Mix; Takara) を用いて T-vector pMD20 プラスミド (Takara) へクローニングし、コンピテントセル DH5 α (Takara) へ形質転換した。形質転換された株から各標的領域を含むプラスミドをそれぞれ QIAprep Spin Miniprep kit を (Qiagen) 用いて精製した。精製したプラスミド DNA を鋳型として当該プライマーペアによる PCR 増幅を行い、標的サイズの PCR 増幅産物が得られることを確認した。

10) 協力機関へのプライマーセットおよびコントロール DNA の配布

項目 7) および項目 9) で作製した O111 IS-P 法プライマーセット (FS ver.2, RS ver.2 の 2 セット) と PCR コントロール DNA を協力機関である富山県衛生研究所、大阪健康安全基盤研究所、福岡県保健環境研究所の 3 機関へ送付し、実際に分離株 (異なる事例由来株および集団感染事例由来株) を用いて、個々の機関が使用している PCR 機器や泳動機器を用いて検討し、機器の違いによる増幅効率や泳動像の差異を検証した。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

1) O111 IS-P 法プロトタイプ作製の作製

プロトタイプ作製に際し、IS 挿入部位 30 か所のうち 5 か所については、IS 挿入部位前後 1kbp の配列がゲノム上に複数存在することから、非特異増幅を避ける目的で PCR の標的から除外した。また、2 か所の挿入部位に関しては F 領域が上記と同様の理由で標的から除外された。最終的に F セット、R セット

はそれぞれ 25 領域、27 領域を標的とし、それぞれを 3 組 (1st-, 2nd-, 3rd-F primer set, 1st-, 2nd-, 3rd-R primer set) に分けて計 6 PCR で判定出来る反応系とした。プライマー長は 19-21 bp、T_m 値は 58~62°C になるよう設計した。PCR 条件の至適化の判定には、11128 株の精製ゲノム DNA を鋳型として使用し、PCR・泳動ともに良好な結果が得られた (図 3)。

2) O111 IS-P 法プロトタイプによる菌株識別解像度の検証

系統の離れた O111 206 株について、IS-P 法プロトタイプ 6 プライマーセットを用いた PCR を実施した。その結果、各プライマーセットにより泳動パターンに違いが見られることが分かった (図 4: FS1 セットの泳動例)。6 セットの PCR により得られたバンドパターンを基に cluster ソフトでデンドログラムを作成した (図 5)。その結果、206 株が 149 パターンに分かれること、同じバンドパターンを示す株が 2 株 (23 タイプ)、3 株 (7 タイプ)、4 株以上 (5 タイプ) 検出されること、また、計 52 領域の標的に対して検出バンドの本数が 15 本未満の株が 19 株存在することなどが明らかとなった。

3) 非特異増幅プライマーの同定

図 6 の例に示すように、FS1-3 および RS1-3 のプライマーセットによるマルチブックス PCR 結果を検証する際、増幅されたバンドの中に目的サイズと明らかに異なるものが見られる株が複数検出された。これらの株について、各プライマーセットに含まれる外側プライマーの個別 PCR を行うことで、その非特異増幅バンドがどのプライマーに由来するかを同定した。この解析により、計 8 個の外側プライマーをプロトタイプから削除した。

4) O111 IS-P 法プロトタイプからの菌株識別解像度の低いプライマーの除去

項目 2) の解析結果から、PCR 陽性が 5 株未満であった部位を 9 か所、180-190 株で PCR 陽性であった部位を 8 か所、190 株以上で PCR 陽性であった部位を 2 か所同定した。この結果を基に、同定した計 19 か所のうち、190 株以上で PCR 陽性であった 1 か所を除く 18 か所について標的候補から削除した。なお、190 株以上で陽性となった 1 か所については、PCR の陽性コントロールとして採用した。

項目 2)、項目 3) の過程を経てプロトタイ

から採用されたプライマーセットでは、206株が108パターンに分かれ、菌株識別解像度が極端に下がる系統も見られた(図7)。

5) 206株におけるIS629挿入部位の網羅的抽出
O111株206株のMiSeqリードを参照株へのマッピングした結果、IS629が挿入されていると推定され、菌株識別解像度の向上に有効と考えられる領域を約70か所同定した。この中には、参照株に存在する部位含まれており、新規IS629挿入部位としては約40か所同定された。

6) 菌株識別解像度向上に向けた新規IS629挿入部位の検討
206株のドラフトゲノム情報から新たに同定したIS629挿入部位について、項目3)、4)で選別したプライマーセットの結果から得られたデンドログラム(図8)の結果にその有無をプロットした結果、菌株識別解像度が図5のように164パターンへと向上した。また、この中で菌株識別解像度の特に低い系統に存在する新規IS挿入部位を4か所選定した。

7) O111 IS-P法プロトタイプからのプライマー選別および改良

FS ver.1プライマーセットにおいて用いた12か所の標的IS挿入部位のうち2か所については、PCR増幅サイズが類似しているため、増幅サイズが異なるようにプライマーを再設計した。また、2か所については、その利用により菌株識別解像度に影響が少ないため、プライマーセットから除いた。RS ver.1プライマーセットにおいても同様、PCR増幅サイズが類似しているものについては、増幅サイズが異なるようにプライマーを再設計した。また、2か所については、その利用により菌株識別解像度に影響が少ないため、プライマーセットから除いた。

項目6)で選定した206株のドラフトゲノム配列データから同定した菌株識別解像度の向上に繋がる4領域について、ver.1プライマーセットにおいて除去したプライマーのPCR増幅バンドサイズと入れ替える形で新たに4領域を検出可能なプライマーを設計し、それらを加えたものをFS、RS ver.2プライマーセットとした。また、この2プライマーセットを用いて系統の離れた206株について解析を行った結果、113パターンに分かれる(図9)ことを確認した。

8) PCRおよび泳動条件の再最適化

項目7)でプライマーの入れ替えを行ったことにより、PCRおよびPCR増幅産物の電気泳動の条件を再検討した。PCR条件については、前年度に構築した最適条件で問題なく機能したが、電気泳動条件については、1.5-3.0%のゲル濃度で検討を行い、MyRunによる電気泳動では1.5%で最も明確な泳動像が得られることが明らかとなった(図10)。

9) PCRコントロールDNAの作製

項目1)で作製したFS ver.2、RS ver.2プライマーセットに含まれる計24か所のIS629挿入部位について、クローニングベクターpMD20へクローニング、精製した。標的部位のうち1か所は形質転換株の増殖効率が悪かったため、大量培養しPlasmid Midi kit (Qiagen)を用いて精製した。クローニング成否の確認は、各精製プラスミドについて標的部位を増幅したプライマーを用いて行ったが、いずれも単一バンドのみ検出されたことから、FS ver.2およびRS ver.2のそれぞれの鋳型DNAとなるよう、各精製プラスミドを各20ng/μlになるよう混合した。

10) 協力機関におけるプライマーセットおよびコントロールDNAの検討

FS ver.2およびRS ver.2プライマーセットを用い、協力3機関(A、B、C)において、臨床分離株とPCRコントロールDNAを用いたPCRおよび泳動に関する検討を実施した。
機関A：散発事例由来株10株および3つの集団感染事例由来株(事例①6株、事例②6株、事例③6株)の計28株(表3)を用いて検討した。Mupidを用いた泳動では、3%ゲルでバンドの識別が容易であることが分かった。PCRコントロールDNAの結果から、FS ver.2では4F(644bp)と5F(620bp)、RS ver.2では1NR(986bp)と2NR(887bp)のバンドがそれぞれ判別しにくいという結果であった。また、RS ver.2では5R(637bp)と9R(306bp)の増幅効率が悪かった。散発事例由来株では、全ての株で異なるバンドパターンが得られた(図11a)。また、集団感染由来株では3事例ともに同一バンドが検出された(図11b)。
機関B：散発事例由来株12株および集団感染事例由来3株の計15株(表4)を用いて検討した。PCRコントロールDNAの結果から、FS ver.2では4F(644bp)と5F(620bp)、RS ver.2では1NR(986bp)と2NR(887bp)のバンドがそれぞれ判別しにくいという結果で

あった。また、RS ver.2 では 5R (637bp) と 9R (306bp) の増幅効率が悪かった。散発事例由来株では、3 株が同じバンドパターンであったが残り異なるパターンとなった (図 13a)。また、集団感染由来株では 3 事例ともに同一バンドが検出された (図 12a)。また、Mupid を用いた泳動では 3%ゲルでバンドの識別が容易であった (図 12a, b)。

機関 C : 散発事例由来株 21 株および 8 つの集団感染事例由来株 (8 事例, 計 25 株) の計 46 株 (表 5) を用いて検討した。PCR コントロール DNA の結果から、FS ver.2 では 4F (644bp) と 5F (620bp)、RS ver.2 では 6R (502bp) と 7R (475bp) のバンドがそれぞれ判別しにくいという結果であった。また、RS ver.2 では 5R (637bp) と 9R (306bp) の増幅効率が悪かった。散発事例由来株では、3 組計 8 株が同じバンドパターンを示し、バンドが検出されない株も 2 株 (O111 であることを確認済み) 存在した (図 13a, 表 4)。また、集団感染由来株では 8 事例ともに同一バンドが検出された (図 13b, 表 4)。また、Mupid-exU (Mupid) を用いた泳動では 1.5%で良好な結果が得られた。

マイクロチップ電気泳動 MultiNA を用いた機関 B による検討: 通常のゲル電気泳動と同様、FS ver.2 では 4F (644bp) と 5F (620bp)、RS ver.2 では 1NR (986bp) と 2NR (887bp)、6R (502bp) と 7R (475bp) のバンドがそれぞれ判別しにくいことが明らかになった (図 14)。しかしながら、RS ver.2 の 6R (502bp) と 7R (475bp) については、菌株により判別できる場合もあり、株間で IS 挿入部位に多様性がある可能性が示唆された (図 15)。

D. 考察

本研究では O111 IS-P 法の開発のため、①全ゲノム解析株 11128 株の IS629 挿入部位 (30 か所) を基にしたプロトタイプ (FS1-3, RS1-3 の 6 セット) の構築、②206 株によるプロトタイプの有用性検討、③2 プライマーセット (FS ver.1, RS ver.1 の 2 セット) への選定、④206 株から同定した IS 挿入部位の新規標的部位としての追加 (FS ver.2, RS ver.2 の 2 セット)、⑤PCR および電気泳動条件の至適化、⑥協力機関による試用という 6 つの段階に分けて研究を実施し、本法の検査現場で実用化を目指した。最終的に構築した 2 セットにしたことで、206 株を 113 パターンに分類するという解像度にとどまったが、

協力機関での検討により、少なくとも集団感染事例の同定ツールとしては十分に機能することが証明された。しかしながら、系統が近いと思われる株での菌株識別解像度を上げることができなかった点、また、分離数は少ないものの、系統関係が遠い小集団については、解像度を十分に上げることが出来なかった。また、PCR や電気泳動など各機関で使用されている機器により結果が変わることも明らかとなり、本法の実用化にはさらなる改良が必要である可能性が示唆された。

E. 結論

本研究により、O111 IS-P 法として、2 チューブによる PCR で EHEC O111 の集団感染を容易に同定することが可能な、また、菌株識別解像度もある程度高い検出系を構築することができた。しかしながら、使用する機器によって結果が異なることもあり、EHEC O157 で実用化されている O157 IS-printing system のように各施設で均一な結果が得られるようなシステムにするためには、さらなる改良と至適化を行う必要がある。

F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

大岡唯祐、李謙一、桂啓介、伊豫田淳、藺牟田直子、林哲也、大西真、西順一郎：腸管出血性大腸菌 O111 用 IS-printing system の開発、第 22 回 腸管出血性大腸菌感染症研究会、2018 年 11 月 8-9 日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1 FS ver.2, RS ver.2 プライマー情報

FS ver.2

	primer name	primer_F	length	Tm	product size	
IS629 outside primer F	1NF	TAG	G	19	60	896
	2NF	GAG	AG	20	60	803
	3F	GCC	G	19	58	711
	4F	CTG	GAG	20	62	644
	5F	ACC	C	19	62	620
	6F	CCG	G	19	58	531
	7F	GCC	C	19	58	485
	8F	GCC	TG	20	62	387
	9F	ATC	C	19	62	312
	10F	GAG	TG	21	60	272
	11F	GCC	C	21	60	234
	12F	GAG	GCC	21	62	201
IS629 inside primer R	IS629IN-R2	CTCAGGGAGTTTAGTCTCCAGG	22	66	-	

RS ver.2

	primer name	primer_R	length	Tm	product size	
IS629 outside primer R	1NR	GTC	C	19	62	986
	2NR	CCG	CAAG	22	60	887
	3R	TCC	A	19	58	776
	4R	CAG	CA	20	60	711
	5R	ATC	GC	20	58	637
	6R	GAG	CA	19	58	502
	7R	ACC	C	19	62	475
	8R	GAG	AC	19	62	364
	9R	TCC	CG	19	62	306
	10R	GAG	GC	19	60	274
	11R	CAG	G	19	58	236
	12R	CAG	A	20	60	198
IS629 inside primer F	IS629IN-F3	TCTGGCAGCCTGAGTTCACAG	22	66	-	

※NF, NR : Ver.2 で新たに追加した標的部位に対するプライマー

※プライマー配列については未発表データのため非公開

表 2 使用した PCR および電気泳動機器

	PCR機器	泳動機器
機関A	TaKaRa TP650 PCR Thermal Cycler Dice Standard	Mupid
機関B	TaKaRa TP350 PCR Thermal Cycler Dice Touch	Mupid
機関C	Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler	Mupid-exU(Mupid)
鹿児島大	Biometra T-professional	MyRun

表3 機関Aの解析株情報

No.	菌株名	分離年	O	H	
S1	1581	1998	111	NM	
S2	2151	2002	111	NM	
S3	2320	2004	111	NM	
S4	2429	2005	111	28	
S5	3002	2008	111	NM	
S6	3041	2009	111	NM	
S7	3111	2010	111	NM	
S8	3497	2013	111	NM	
S9	3703	2015	111	NM	
S10	3713	2015	111	NM	
集団感染事例①	O1	1853	2000	111	NM
	O2	1882		111	NM
	O3	1883		111	NM
	O4	1884		111	NM
	O5	1885		111	NM
	O6	1886		111	NM
集団感染事例②	O7	2695	2006	111	NM
	O8	2701		111	NM
	O9	2702		111	NM
	O10	2703		111	NM
	O11	2704		111	NM
	O12	2705		111	NM
集団感染事例③	O13	3188	2011	111	NM
	O14	3190		111	NM
	O15	3192		111	NM
	O16	3195		111	NM
	O17	3196		111	NM
	O18	3197		111	NM

表4 機関Bの解析株情報 ●：同じバンドパターン

	菌株番号	分離年	O抗原型	H抗原型	Stx;RPLA	備考	
散発事例株	PV221	1997	111	NM[8]	1		
	11H461	1999	111	NM[8]	1		
	● 13H38	2001	111	UT[8]	1+2		
	14H163	2002	111	NM[8]	1+2		
	PV06-50	2006	111	NM[8]	1+2		
	PV07-37	2007	111	NM[8]	1		
	● PV07-55	2007	111	8	1		
	PV07-157	2007	111	UT[8]	1+2		
	● PV08-103	2008	111	NM[8]	1+2		
	PV12-41	2012	111	NM	1		
	PV13-59	2013	111	NM	1		
	PV14-37	2014	111	NM	1		
	集団感染事例	PV15-30	2015	111	NM	1+2	PV15-30-32は家族
		PV15-31	2015	111	NM	1+2	PV15-30-32は家族
PV15-32		2015	111	NM	1+2	PV15-30-32は家族	

表5 機関Cの解析株情報

● ● ● : それぞれ同じバンドパターン

ID	菌株名	血清型(O)	血清型(H)	ヘリコバクテリウム型	分離年	MLVA型	遺伝子型																実験備考
							112	213	ref	ref	ref	ref	ref	ref	ref	ref	ref	ref	ref	ref	ref	ref	
1	97E2	O111	H-	Stx1	1997		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
2	97E17	O111	H-	Stx1 + Stx2	1997			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
3	97E22	O111	H-	Stx1	1997			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
4	98E10	O111	H-	Stx1 + Stx2	1998			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
18	05E030	O111	H-	Stx1	2005			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
19	06E024	O111	H-	Stx1	2006			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
22	06E044	O111	H-	Stx1 + Stx2	2006			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
27	07E089	O111	H-	Stx1	2007			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
28	07E097	O111	H-	Stx1 + Stx2	2007			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	stx+, 血清O111 再確認済	
29	08E008	O111	H-	Stx1 + Stx2	2008			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
30	08E042	O111	H-	Stx1 + Stx2	2008			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
31	08E105	O111	H-	Stx1	2008			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
32	10E012	O111	H-	Stx1	2010			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
33	12E043	O111	H-	Stx1	2012			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
34	12E112	O111	HUT	Stx1	2012			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
35	12E123	O111	H-	Stx1 + Stx2	2012			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
36	13E021	O111	H-	Stx1 + Stx2	2013			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
39	16E023	O111	H-	Stx1	2016	16m3023		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
40	16E094	O111	H-	Stx1	2017	17m3003		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	stx+, 血清O111 再確認済	
41	17EC005	O111	H-	Stx1 + Stx2	2017	17m3008 19m3022		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
45	19EC004	O111	H-	Stx1 + Stx2	2019	19m0177		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
5	98E17	O111	H-	Stx1 + Stx2	1998			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
6	98E18	O111	H-	Stx1 + Stx2	1998			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
7	99E18	O111	H-	Stx1	1999			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
8	99E19	O111	H-	Stx1	1999			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
9	99E20	O111	H-	Stx1	1999			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
10	99E21	O111	H-	Stx1	1999			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
11	99E22	O111	H-	Stx1	1999			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
12	99E23	O111	H-	Stx1	1999			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
14	04E020	O111	H-	Stx1	2004			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
15	04E021	O111	H-	Stx1	2004			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
17	04E023	O111	H-	Stx1	2004			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
20	06E036	O111	H-	Stx1	2006			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	F set 430bp付近にExtraband	
21	06E037	O111	H-	Stx1	2006			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	F set 430bp付近にExtraband	
23	07E012	O111	H-	Stx1 + Stx2	2007			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	F set 1000bp付近にExtraband, R set 900bp付近にExtraband,	
24	07E013	O111	H-	Stx1 + Stx2	2007			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	F set 1000bp付近にExtraband, R set 900bp付近にExtraband,	
25	07E019	O111	H-	Stx1 + Stx2	2007			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	F set 1000bp付近にExtraband, R set 900bp付近にExtraband,	
37	16E005	O111	H-	Stx1	2016			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
38	16E006	O111	H-	Stx1	2016	16m3007		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
42	18EC039	O111	H-	Stx1 + Stx2	2019	19m3021		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
43	18EC040	O111	H-	Stx1 + Stx2	2019	19m3021		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
44	18EC041	O111	H-	Stx1 + Stx2	2019	19m3021		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
46	19EC012	O111	H-	Stx1 + Stx2	2019	19m3040		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
47	19EC013	O111	H-	Stx1 + Stx2	2019	19m3040		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
48	19EC015	O111	H-	Stx1 + Stx2	2019	19m3040		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
49	19EC016	O111	H-	Stx1 + Stx2	2019	19m3041		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

散発事例株

集団感染①

集団感染②

集団感染③

集団感染④

集団感染⑤

集団感染⑥

集団感染⑦

集団感染⑧

図1 O111 IS-P 法の模式図。 IS 内部に外側へ向けて設計した IS 内部プライマーと対になるように外側プライマーを設計することで、IS の前後に F セット、R セットを設計する。

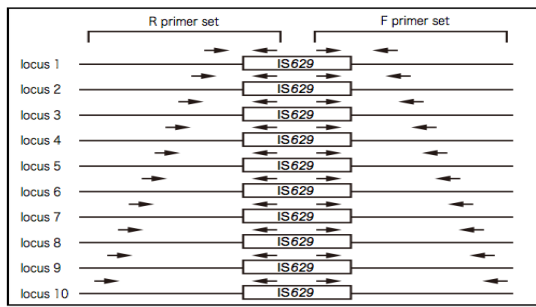


図2 マッピングによる IS629 挿入部位の推定。 参照株へのリードマッピングの結果から、解析対象株に IS 挿入があるかどうかを推定できる。

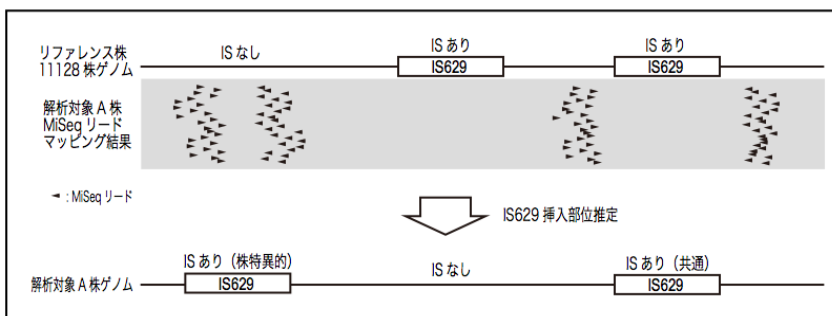
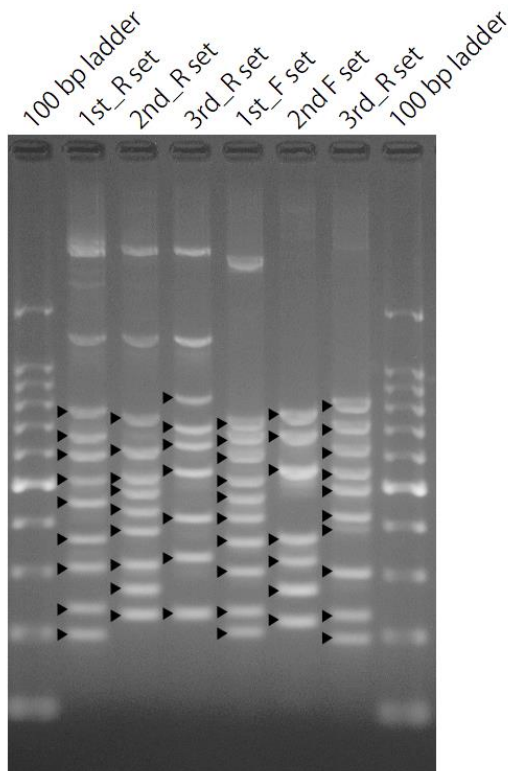


図3 O111 IS-P 法プロトタイプに至適条件および PCR 産物泳動結果。 至適条件で PCR を行った結果、参照株 11128 株 DNA を用いた場合、F セット (計 27 本)、R セット (計 25 本) がバンドはほぼ均一に検出されており、PCR 増幅サイズの識別も可能である。



【PCR反応液】 [15 μ l scale]

Template DNA	1
Primer outside mix (4.5 μ M each)	1
Primer IS629Inside (25pM)	1
2x PCR buffer	7.5
D.W.	4.2
KOD-Multi-&EPI	0.3
Total	15

* primer final conc.: 0.3 μ M

【PCRプログラム】 3 step

1. 94 $^{\circ}$ C 2 min
2. 98 $^{\circ}$ C 10 sec step 2-4: 25 cycles
3. 58 $^{\circ}$ C 30 sec
4. 68 $^{\circ}$ C 1 min

【電気泳動】

2% Agarose S in 0.5 x TBE
Marker: 100 bp ladder

▶: 陽性バンド
(F set 計 27 本, R set 計 25 本)

図4 O111 IS-P 法プロトタイプによる 206 株の PCR・電気泳動結果の例 (FS1 プライマーセット)。
206 株で異なるバンドパターンが得られているが、全くバンドが検出されない株やほぼ全株で検出されているバンドがある。

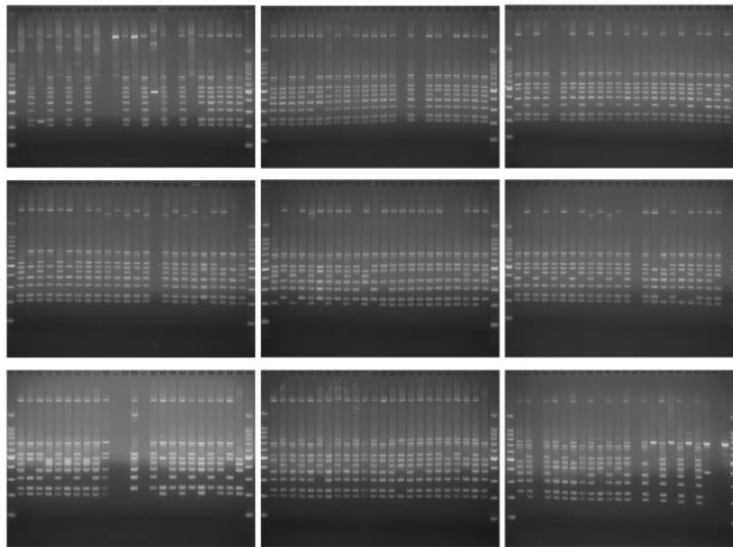


図5 O111 IS-P 法プロトタイプ 6 プライマーセットによる PCR 結果のデンドログラム
FS1-3 および RS1-3 の 6 プライマーセットによる結果から、149 パターンに分類されたが、複数株が同じパターンを示す場合なども見られた。

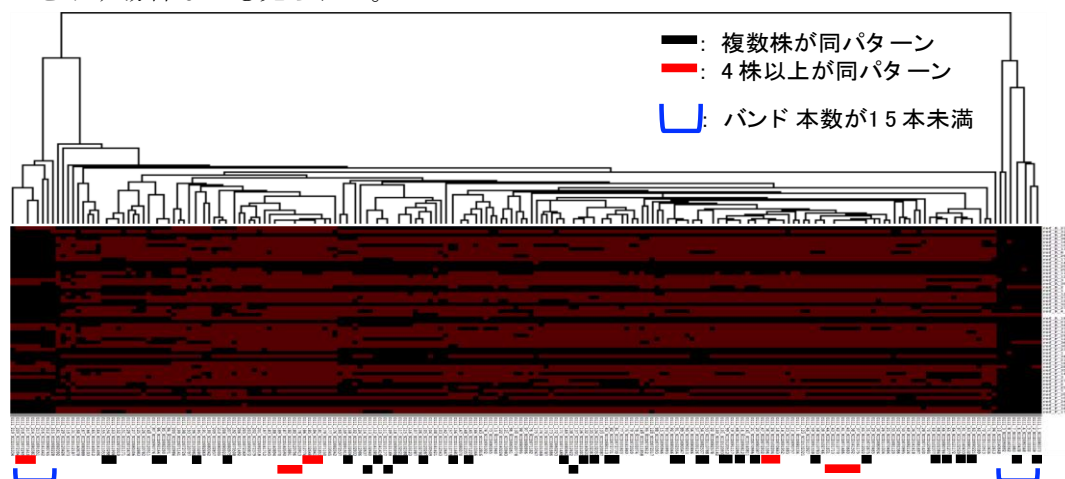


図6 非特異増幅によるバンド検出とその原因プライマーの同定の例 (FS2 セット、NIID072394 株)
NIID072394 株 (および NIID101034 株) で見られた非特異増幅バンド (赤矢印) について個別 PCR による検証の結果、F2 プライマーにより該当バンドが検出されることが判明した。

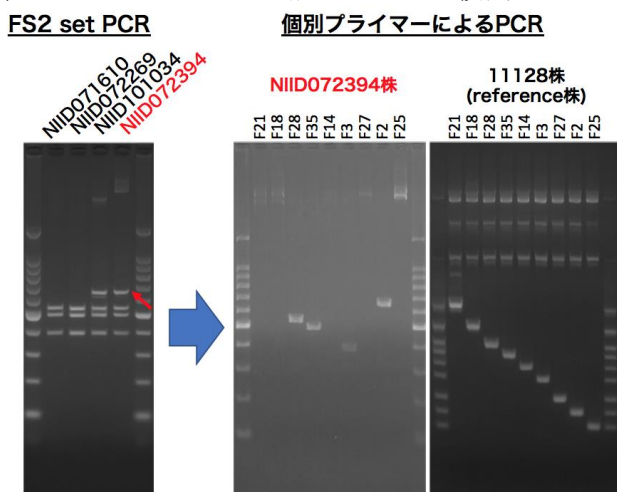


図7 PCR増幅効率が低い、非特異増幅があるプライマーを除去した後の菌株識別解像度。

項目2),3)で該当するプライマーを除去した結果、菌株識別解像度が108パターンに下がり、特に解像度が下がる系統が4グループ検出された。

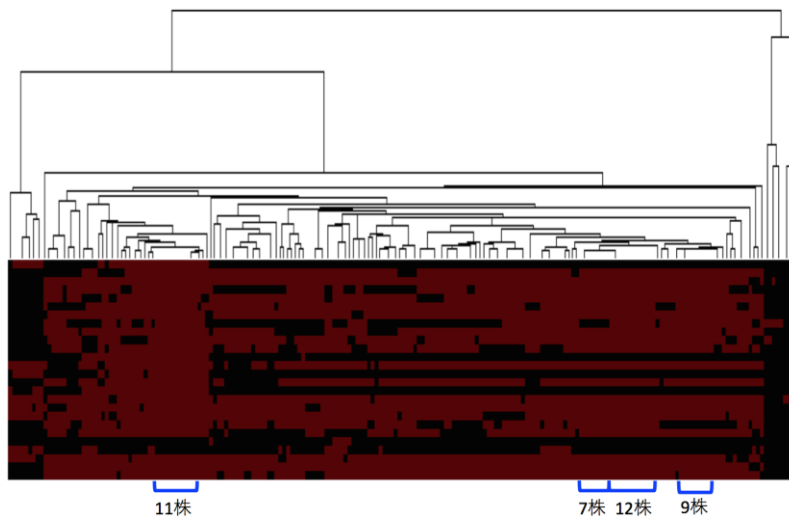


図8 新規IS629挿入部位(29か所)の情報追加による菌株識別解像度の向上

図4のデータに新規IS629挿入部位(計29か所)の情報を追加することにより、108パターンであった菌株識別解像度が164パターンにまで向上した。

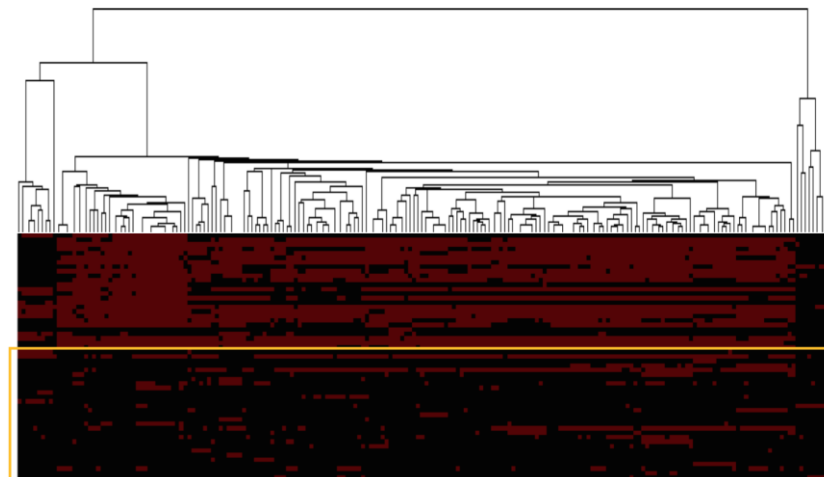


図9 FS ver.2, RS ver.2 プライマーセットによる 206 株による PCR 結果のデンドログラム
 206 株 2 プライマーセットによる結果から、113 パターンに分類された。

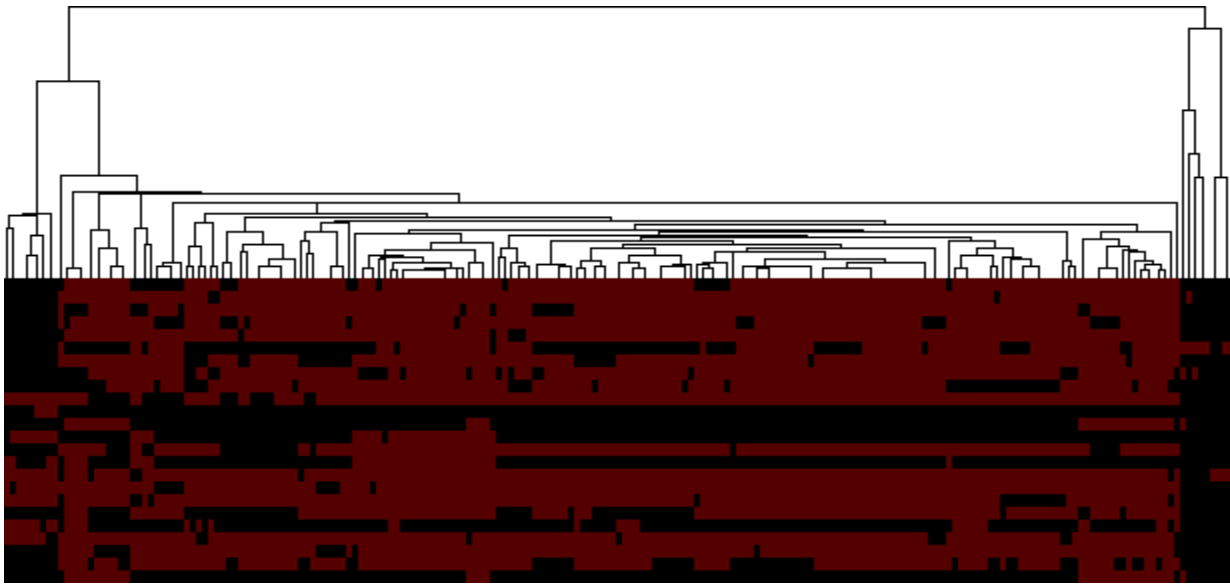
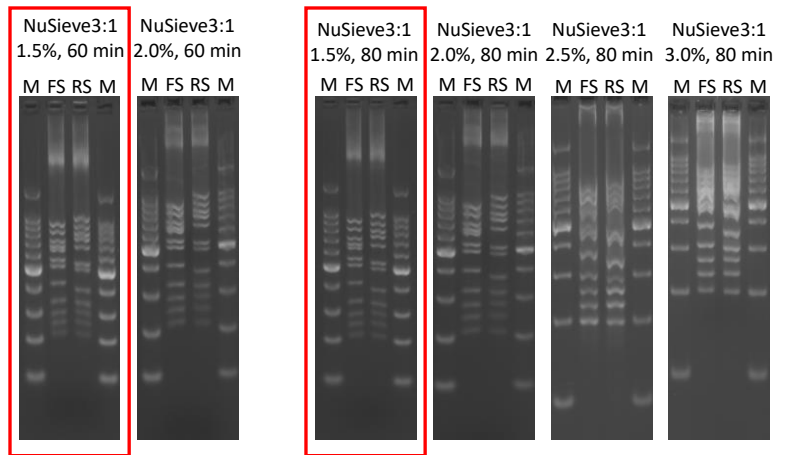


図10 FS ver.2, RS ver.2 プライマーセットによる PCR および泳動条件の検討

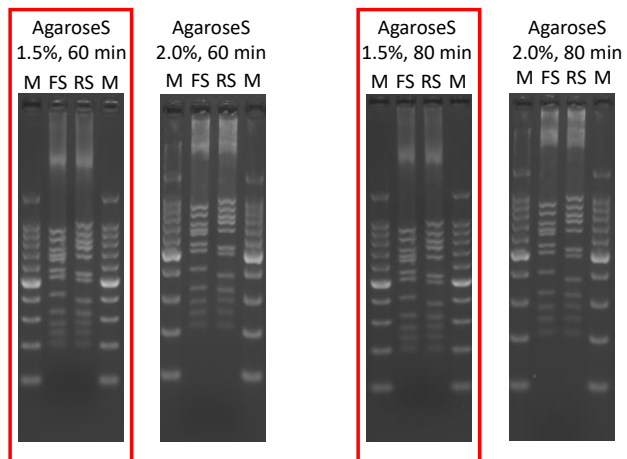
PCR 条件は昨年度と同様であり、全てのバンド (各 12 本) が検出された。また、MyRun による泳動結果から、NuSieve 3:1 および Agarose S のどちらにおいても、1.5%ゲルにおいてバンドの識別が容易であった。

NuSieve 3:1 (in 0.5 x TBE)

Marker (M): 100bp ladder



NipponGene Agarose S (in 0.5 x TBE)



【PCR反応液】 15 μ l scale

template DNA (positive control DNA)	1
primer F or R mix (各5 μ M)	0.75
primer IS629Inside R or F (各50 μ M)	0.75
2 x PCR buffer	7.5
D.W.	4.7
KOD-Multi&EPI	0.3
total	15

【PCR program】 3 step

1. 94 $^{\circ}$ C 2 min
2. 98 $^{\circ}$ C 10 sec
3. 58 $^{\circ}$ C 30 sec
4. 68 $^{\circ}$ C 1 min [step2-4: 25 cycles]

※PCR機器: T-professional (Biometra)

【電気泳動】 濃度1.5-3.0% in 0.5xTBE

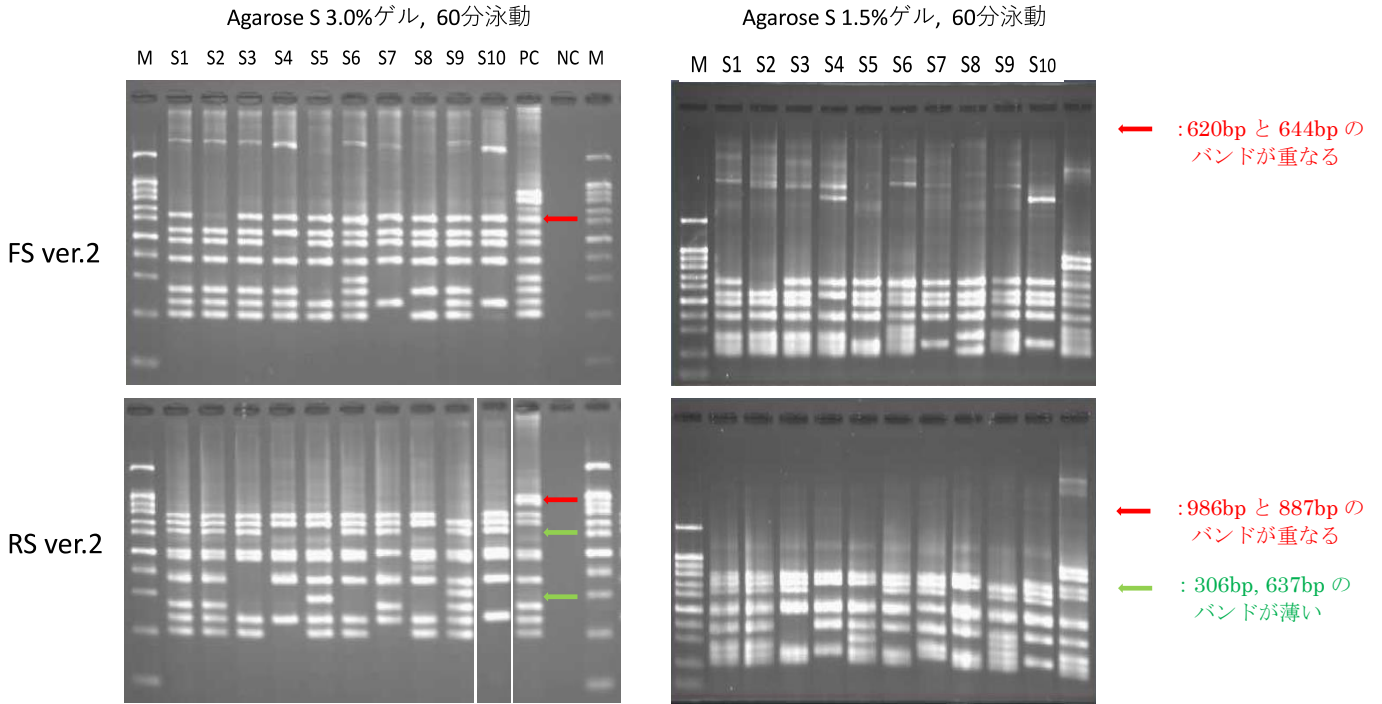
- ゲル: 1. NuSieve 3:1 (Lonza)
 2. Agarose S (Nippon Gene)

Marker: 100 bp ladder

※泳動機器: MyRun

図 11 機関AのPCRおよび泳動結果

a) 散发事例株（10株）での ver.2 プライマーセットの検討：10株のデータから同じバンドパターンを示す株は見られなかった。また、ゲル濃度の比較から、Mupid を用いた場合、3%ゲルの解像度が比較的高いことが明らかとなった。



PCR機器: Takara Dice PT650
泳動機器: Mupid

b) 集団感染事例由来株（3事例, 各6株）での ver.2 プライマーセットの検討：3事例全てで集団感染事例株では同じバンドパターンを示した。

Agarose S 1.5%ゲル, 60分泳動

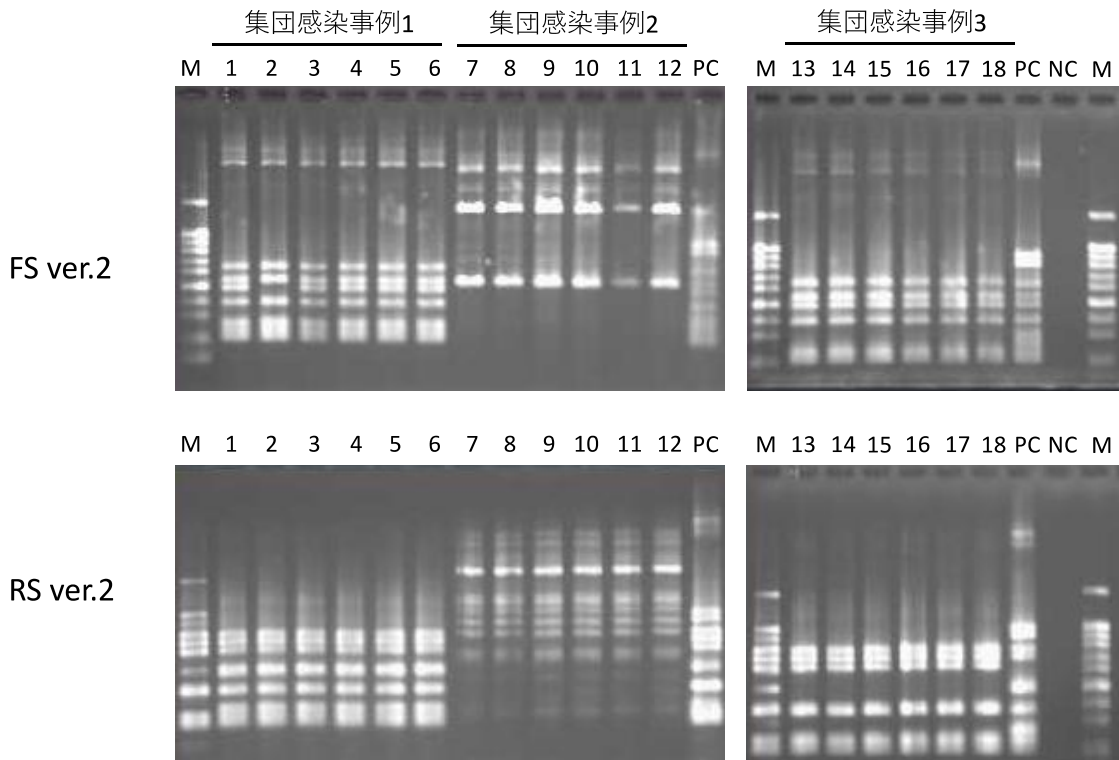
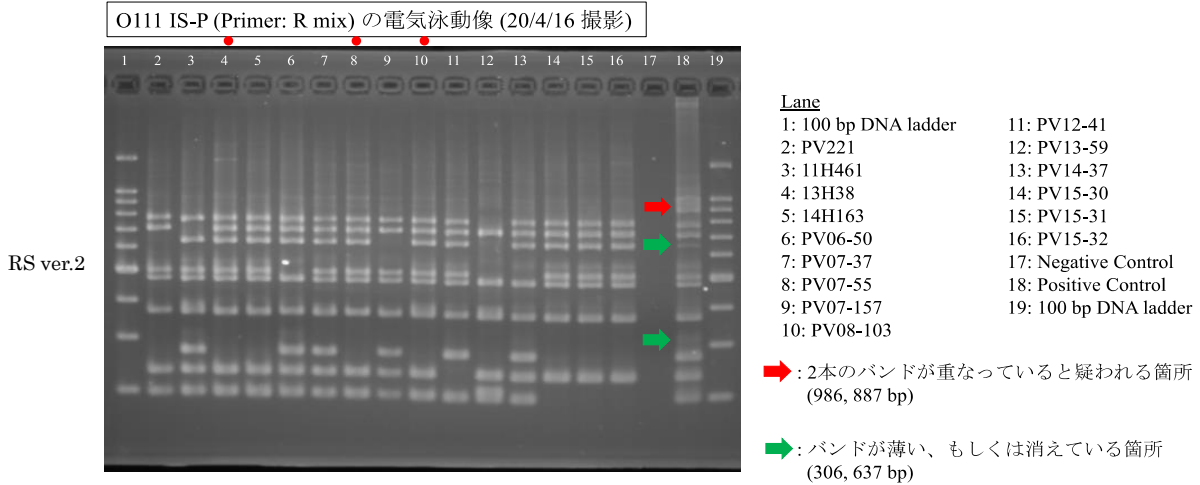
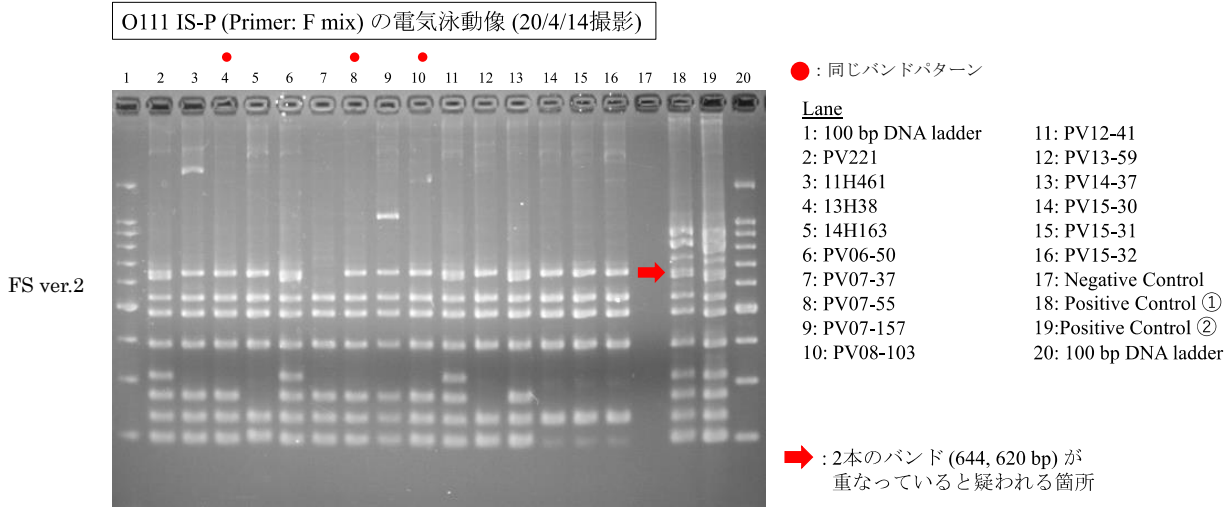


図 12 機関 B の PCR および泳動結果

- a) 散发事例株 12 株のうち、3 株が同じバンドパターンを示した。また、集団感染由来株 (3 株) は同じバンドパターンを示した。



アガロース
 3%(NuSieveGTG:SeaKemGTG=2:1)
 泳動条件
 50V 45min + 100V 45min
 露光時間
 15s(FluorChem Q system使用)

泳動量
 Test sample 1 μL+6x Loading Dye 3 μL (4 μLを泳動)
 PC plasmid mix 1 μL+6x Loading Dye 3 μL (4 μLを泳動)
 100bp Ladder 3 μL

- b) 1.5%アガロースを用いた泳動結果 : 3%と同条件の泳動では 500bp 以下のバンドが流れきってしまった。

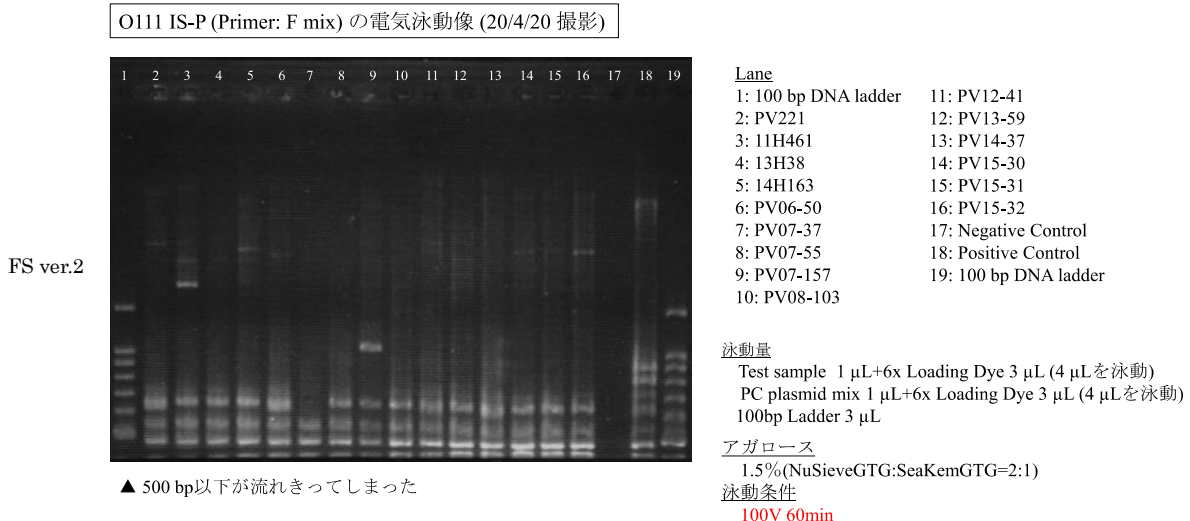
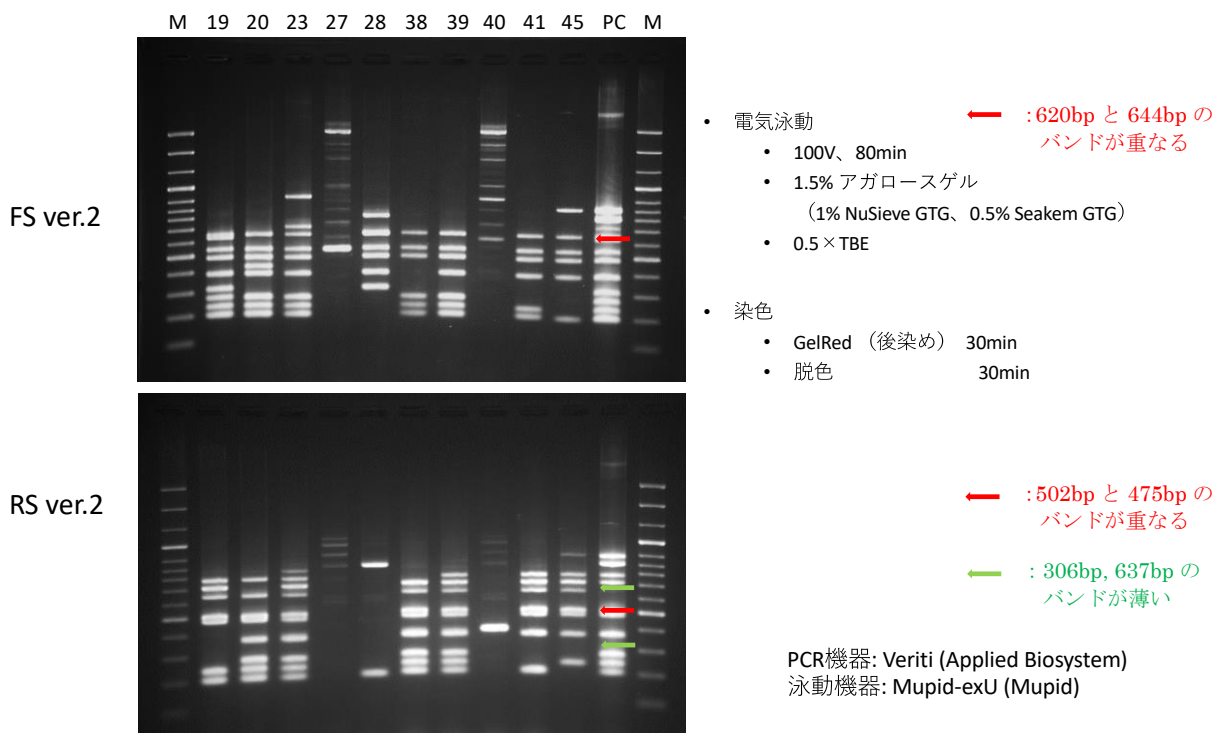


図 13 機関 C による PCR および泳動結果

a) PCR 結果の一部：1.5%ゲルで良好な泳動結果が得られた。



b) 集団感染由来株（事例②, 事例⑤）の結果

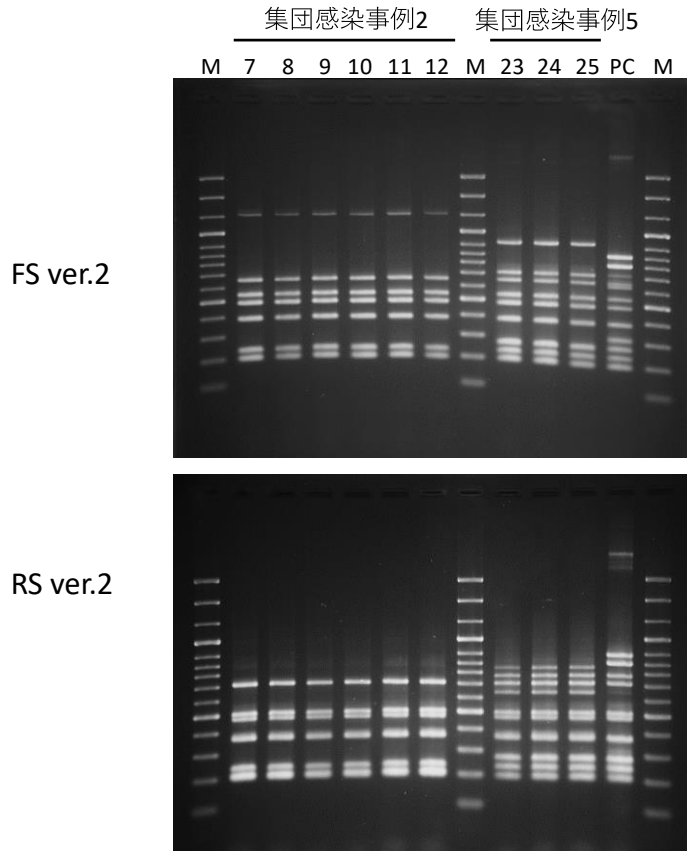
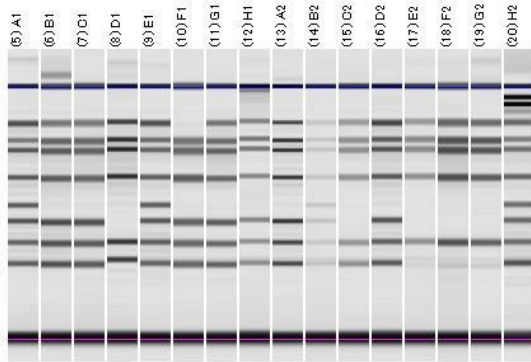


図 14 機関 B による MultiNA を用いた解析結果 1

O111 IS-printing system FS ver.2

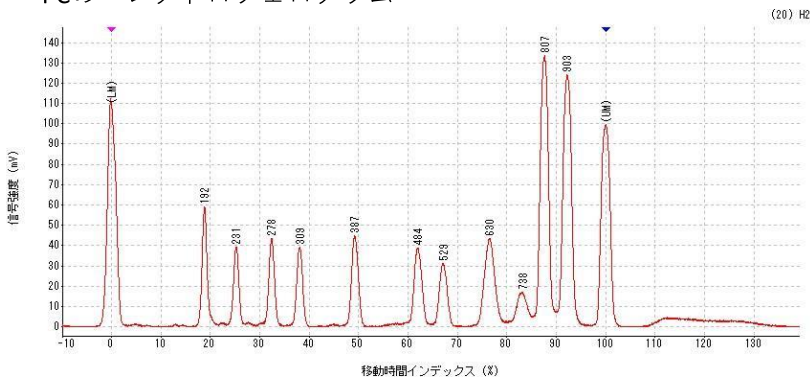
MultiNA DNA 1000 kit

ゲルイメージ



- | | |
|--------------|--------------|
| A1: PV221 | A2: PV08-103 |
| B1: 11H461 | B2: PV12-41 |
| C1: 13H38 | C2: PV13-59 |
| D1: 14H163 | D2: PV14-37 |
| E1: PV06-50 | E2: PV15-30 |
| F1: PV07-37 | F2: PV15-31 |
| G1: PV07-55 | G2: PV15-32 |
| H1: PV07-157 | H2: PC |

PCのエレクトロフェログラム

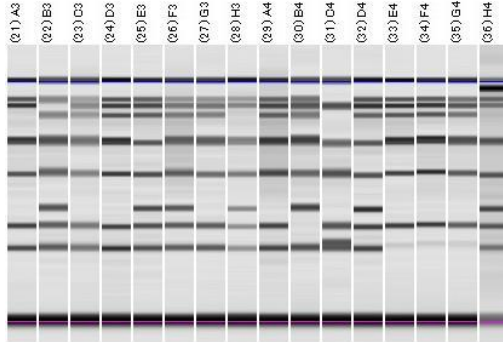


・ 644 bp と 620 bp のピークが重なっている

O111 IS-printing system RS ver.2

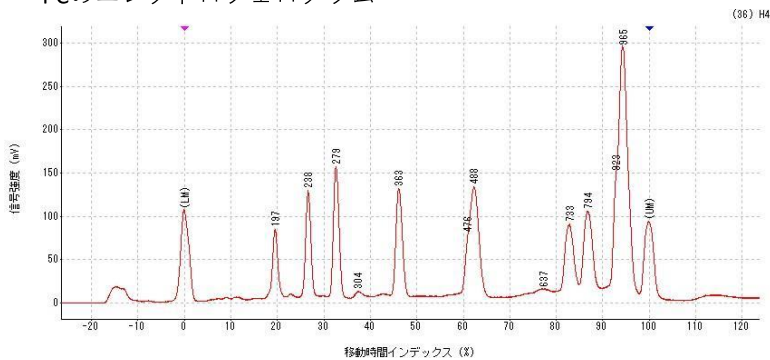
MultiNA DNA 1000 kit

ゲルイメージ



- | | |
|--------------|--------------|
| A3: PV221 | A4: PV08-103 |
| B3: 11H461 | B4: PV12-41 |
| C3: 13H38 | C4: PV13-59 |
| D3: 14H163 | D4: PV14-37 |
| E3: PV06-50 | E4: PV15-30 |
| F3: PV07-37 | F4: PV15-31 |
| G3: PV07-55 | G4: PV15-32 |
| H3: PV07-157 | H4: PC |

PCのエレクトロフェログラム



・ 986 bp と 887 bp、502 bp と 475 bp のピークが重なっている

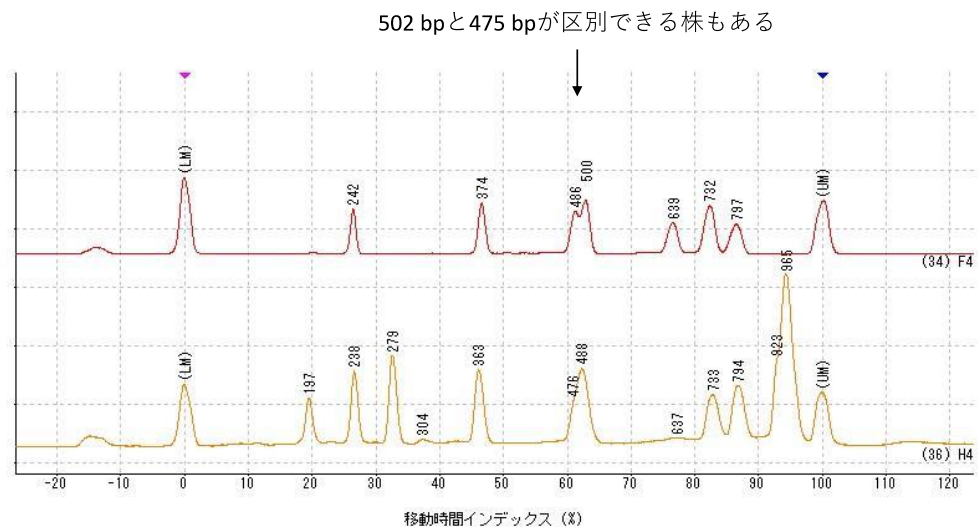
・ 637 bp と 306 bp のピーク弱い

図 15 機関 B による MultiNA を用いた解析結果 2

O111 IS-printing system RS ver.2

MultiNA DNA 1000 kit

PV15-31 (R mix)のエレクトロフェログラム



上段 F4: PV15-31

下段 H4: PC

令和元年度厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

品由来が疑われる有症事案に係る調査（食中毒調査）の迅速化・高度化に関する研究
（H29-食品—一般-001）

迅速化に向けた簡易法の開発-2（EHEC-POT 法）

研究分担者 鈴木 匡弘 藤田医科大学医学部准教授
研究協力者

愛知県衛生研究所 生物学部 山田和弘
秋田県健康環境センター 保健衛生部 檜尾 拓子
東京都健康安全研究センター 微生物部 食品微生物科 小西 典子
千葉県環境保健研究所 健康科学課 吉原 純子
川崎市健康安全研究所 小嶋 由香
富山県衛生研究所 細菌部 木全 恵子
石川県保健環境センター 細菌・飲料水グループ 木村 恵梨子
福井県衛生環境研究センター 保健衛生部 東方 美保
岐阜県保健環境研究所 保健科学部 野田 万希子
岐阜市衛生試験所 微生物検査係 信田 充弘
三重県保健環境研究所 衛生研究室 微生物研究課 永井 佑樹
大阪健康安全基盤研究所 微生物部細菌課 梅川 奈央
神戸市環境保健研究所 感染症部 野本 竜平
島根県保健環境科学研究所 保健科学部 川瀬 遵
福岡県保健環境研究所 保健科学部 江藤 良樹

研究要旨

近年 O157 等主要な腸管出血性大腸菌（EHEC）に加え、O103 等かつては希であった血清型の EHEC による感染事例が増加し、分子疫学解析法を対応させる必要が生じた。従来 of EHEC 分子疫学解析法は O157 等主要な血清型に特化しているため、他の血清型では菌株識別能が不足する傾向にあった。本研究では菌株毎の ORF 保有パターンを multiplex-PCR で検出し、遺伝子型を決定する PCR-based ORF typing 法（POT 法）を EHEC 用に開発することを目的とした。

O103 等 6 血清型のゲノムデータから、POT 法で検出する ORF を選択し、12-plex PCR 2 反応系からなる EHEC-POT 法を開発した。O121

及び O157 以外の多様な血清型において D index 0.997 (O111) ~0.961 (O145) と良好な菌株識別能力を実現した。全国の地方衛生研究所で実施可能としていくことで、希な血清型の EHEC 感染症監視に貢献できると期待される。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、食品を介して伝播することが多く、患者の発生が多地域にまたがることもある。このような diffuse outbreak においては分子疫学解析を行うことで発生を早期に捕捉し、対策を取ることが重要である。原因となる EHEC の血清型としては O157、O26、O111 が代表的なものであり、IS-printing や multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) が普及し、迅速な分子疫学解析が可能となっている。ところが近年、検出される EHEC の血清型として上記以外にも O91、O103、O121、O145、O165 等が増加し、従来の IS-printing や MLVA では菌株識別能力の不足傾向が見られた。そのため、分子疫学解析法を多様な血清型に対応させる必要が生じてきた。

本研究では菌株毎の ORF 保有パターンを multiplex-PCR で検出し、遺伝子型を決定する PCR-based ORF typing 法 (POT 法) を EHEC に対応させることを目的とした。POT 法はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌や緑膿菌等で実用化され、院内感染対策に利用されている分子疫学解析法である。マルチプレックス PCR による ORF の有無を検出する分子疫学解析法であることから、短時間で実施可能かつ遺伝子型の比較やデータベース化が容易である特徴を持つ。大腸菌用の POT 法も開発されているが、薬剤耐性大腸菌が対象であり、EHEC に対する

菌株識別能はきわめて低い。そこで EHEC O26、O111、O91、O103、O121、O145、O165 等を汎用的に識別可能な EHEC-POT 法開発を目指した。

B. 研究方法

検出候補 ORF の抽出と EHEC-POT 法における検出 ORF の決定

H29 年度に、NCBI データベースからダウンロードした 412 株の EHEC ゲノムデータ (O26 115 株、O91 39 株、O103 88 株、O111 86 株、O121 47 株、O145 37 株、) を、検出候補 ORF 選別用データとして用いた。各ゲノムデータは ORF 単位に分割し、相互比較することで、EHEC の遺伝子型決定に用いる検出候補 ORF の選定を行った。

H29~H30 年度にかけて、81 個の検出候補 ORF を選択し、PCR によって 48 株の EHEC (O26 25 株、O103 8 株、O111 7 株、O121 3 株、O145 3 株、O165 2 株) における検出候補 ORF の保有状態調査を行った。さらに、R1 年度には愛知県衛生研究所に保存された 291 株の EHEC (O91 1 株、O103 14 株、O111 10 株、O121 8 株、O145 8 株、O165 1 株、O166 1 株、O26 46 株、O157 202 株) 及び、国立感染症研究所から提供された 110 株の EHEC (O91 10 株、O103 20 株、O111 20 株、O121 20 株、O145 20 株、O165 20 株) から抽出した DNA を用い、各血清

型において十分な菌株識別能力が得られ、なおかつ集団感染事例で同一遺伝子型となるよう、検出 ORF の組み合わせを精査した。

EHEC-POT 法

EHEC-POT 法の Taq としては Qiagen Multiplex PCR kit を Q solution 10% 添加条件で用いた。プライマーはあらかじめ反応系毎に混合し、終濃度各 $0.2 \mu\text{M}$ の条件で用いた。PCR 反応産物は 4% アガロースゲルで電気泳動し、検出 ORF の有無を泳動パターンから読み取った。遺伝子型の数値化には PCR 反応系毎に検出バンドの有無を 1、0 に置き換え 2^n からなる係数をかけ、足し算することで検出パターンを数値化し、POT 型とした。

地方衛生研究所における EHEC-POT 法の評価

R1 年度には全国 14 カ所の地方衛生研究所（秋田県健康環境センター、東京都健康安全研究センター、千葉市環境保健研究所、川崎市健康安全研究所、富山県衛生研究所、石川県保健環境センター、福井県衛生環境研究センター、岐阜県保健環境研究所、岐阜市役所健康部、三重県保健環境研究所、大阪健康安全基盤研究所、神戸市環境保健研究所、島根県保健環境科学研究所、福岡県保健環境研究所）にプライマー、Taq ポリメラーゼ、陽性コントロール DNA を送付し、各地方衛生研究所における保存株を用いた EHEC-POT 法の評価を行った。

（倫理面への配慮）

本研究においては患者情報から切り離された菌株のみを扱うため、倫理上の問題は

発生しない。

C. 研究結果

検討した全ての血清型で汎用的に菌株識別できると予測された ORF は見つからなかったが、2-4 血清型で菌株識別に利用可能と予測される ORF が 81 個見つかった。この 81 個の ORF の保有パターンによって、in silico においては検討で用いたゲノムデータ株の多くが識別可能であった。

分離株による 81 個の ORF の保有状態調査の結果、81 個すべては菌株により保有状態は異なっていたが、その中から EHEC-POT 法の菌株識別能力向上に寄与するものを選別することで、従来分けられなかった株の多くが識別可能となった。

検出 ORF 選別の結果、検出候補 ORF のうち 21 個の ORF を検出することで、O121 及び O157 を除く各血清型で汎用的に利用可能かつ、十分な菌株識別能力が得られることが判明した。EHEC-POT 法は上記 21 個の ORF に加え、*eae* 遺伝子及び大腸菌のマーカーを加えた 12-plex PCR、2 反応系からなる、検出系となった。

愛知県衛生研究所保有株および感染症研究所提供株 DNA 並びに各地方衛生研究所から O26 46(44)株、O91 34(31)株、O103 113(102)株、O111 30(27)株、O121 72(58)株、O145 97(79)株、O157 202(202)株、O165 39(35)株、その他 45(40)株の合計 678(618)株のデータが得られた（かつこ内は集団事例を除いた株数）。集団感染事例を除いた菌株を用いた各血清型の POT 型の数、及び *D* index は表 1 のとおりである。O26、O111、O103、O165 では *D* index 0.997~0.978 と高い菌株識別

能となった。また、その他の希な血清型では O152 の 1 株のみ ORF が全く検出されずタイプング不能であったが、その他の 39 株における D index は 0.993 と、十分な菌株識別能力を示し、EHEC-POT 法の開発に関与しなかった分離株においても菌株識別能力は確保されていた。また、O157 及び O121 を除き、ほとんどの血清型において、特定の POT 型への極度な偏りは見られなかった。その一方、O157 では特定の 3 遺伝子型が全体の 31.7% (202 株中 64 株) を占めており、菌株識別能力の低下に繋がった。また、O121 においては特定の 2 遺伝子型に全体の約 8 割 (58 株中 45 株) が集中した。EHEC-POT 法によって、O121、O157 を除く血清型の EHEC を汎用的にタイプングすることができた。

集団事例 (21 事例) 由来の 60 株については、20 事例由来の 57 株では同一集団内で同一 POT 型となった。しかし O121 による 1 事例については、3 株中 1 株が異なる POT 型となった。

表 1 各血清型における菌株識別能力
(同一事例由来株を除く)

血清型	株数	POT 型数	D index
O26	44	36	0.992
O91	31	21	0.968
O103	102	58	0.983
O111	27	26	0.997
O121	58	11	0.702
O145	79	40	0.961
O157	202	66	0.957
O165	35	25	0.978

その他	40	35	0.993
-----	----	----	-------

D. 考察

O157、O121 を除き多様な血清型の EHEC を EHEC-POT 法を用いてタイプングすることができた。EHEC-POT 法は特定の血清型に特化せず、多くの EHEC 分離株に適用することができると考えられる。

その一方、O157 及び O121 による分子疫学調査はできないと考えられた。この研究では O157 を対象血清としなかったため菌株識別能の確保が十分に行われていない。O157 に関しては MLVA や IS-printing が普及しているため、新たな手法の必要性は低いと考えられる。O121 についてはきわめて多様性の少ないグループであり、POT 法の原理では十分な菌株識別能を実現することはできないと考えられた。MLVA 等、POT 法以外の手法でタイプングする必要がある。

全国 14 カ所の地方衛生研究所にプライマーセット及び Taq ポリメラーゼを送付し、検討した結果全ての施設で良好な PCR 反応結果が得られている。また、ほとんど (21 事例中 20 事例) の集団事例において、同一事例の POT 型は同一となり、遺伝子型が安定して得られることも確認できた。このことから EHEC-POT 法は多くの施設で実施可能であり、大部分の EHEC 血清型のタイプングと遺伝子型共有に有効であることが示された。MLVA が普及している血清型 (O157、O26、O111) 以外の diffuse outbreak 監視に EHEC-POT 法は有効と考えられる。メーカーによるキット販売あるいは改良 EHEC-POT 法のプロトコル開示

によって、全国の地方衛生研究所で実施可能としていくことで、マイナーな血清型の EHEC 感染症監視に貢献できると期待される。

E. 結論

EHEC-POT 法によって、O121 と O157 を除くほとんど全ての血清型の EHEC を、実用上問題の無い菌株識別能力で、汎用的に分子疫学解析できる。全国の地方衛生研究所で実施可能としていくことで、マイナーな血清型の EHEC 感染症監視に貢献できると期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 23 回腸管出血性大腸菌感染症研究会
「腸管出血性大腸菌 PCR-based ORF Typing (POT) 法の改良とその評価」 2019 年 11 月 14 日、15 日（発表日 15 日） 愛媛県松山市

第 93 回日本細菌学会総会 「EHEC-POT 法と MLVA 法の菌株識別能力の比較」 2020 年 2 月 19～21 日（発表日 20 日） 愛知県名古屋市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
令和元年度 分担研究報告書

食品由来が疑われる有症事案に係る調査（食中毒調査）の迅速化・高度化に関する研究
分担課題 食品媒介感染症・食中毒の疫学調査手法の整備に関する研究

研究分担者	砂川 富正	（国立感染症研究所感染症疫学センター・室長）
研究協力者	高橋 琢理	（国立感染症研究所感染症疫学センター・主任研究官）
研究協力者	土橋 西紀	（国立感染症研究所感染症疫学センター・主任研究官）
研究協力者	加納 和彦	（国立感染症研究所感染症疫学センター・主任研究官）
研究協力者	駒瀬 勝啓	（国立感染症研究所感染症疫学センター・再任用研究員）
研究協力者	高原 理	（国立感染症研究所感染症疫学センター・非常勤職員）
研究協力者	神谷 元	（国立感染症研究所感染症疫学センター・主任研究官）

研究要旨

本分担グループでは、感染症発生動向調査事業（NESID）の患者・病原体データと国立感染症研究所病原体部が有するより詳細な菌株データ（MLVA データ等）を効率的に連携させるシステムを構築し、統合されたデータの活用方法について検討を行う。また、NESID データに基づく広域事例疑い探知システムの構築および改良を行い、広域事例の早期探知と情報共有、迅速な調査へとつなげる方法について検討する。さらに、長期的な視点から、実際の広域事例の発生要因の調査について、食材そのものを管理する農林部局との連携が欠かせないことが考えられる。具体的に、食品衛生分野における HACCP との連携、農業分野における GAP との連携について、システムを幅広く含めていくための必要な情報を国内外から収集し、実装するシステムに一部具体的に反映させていくことを検討する。

NESID データと MLVA データを効率的に突合するシステムを開発した。統合されたデータの効果的な活用方法については、引き続き検討が必要である。また、NESID データに基づく広域事例疑いの探知システムを構築し、2018 年から稼働させている。2019 年にはアラート閾値設定の見直しなどシステムの改良を行い、複数の事例において厚生労働省へ早期の情報共有を行うことができた。実際の事例への適用についても一部行い、システムによる広域事例の探知、分析、さらには感染源の探索について活動し、事例探知後の調査手法の整備に関する検討を行った。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症事例発生時の調査・対策上の課題として、患者情報（疫学情報）と病原体情報（菌株情報）の連携が迅速に行えないことが従前より指摘されている。本分担グループにおいては、感染症発生動向調査（NESID）の患者データ・病原体データと国立感染症研究所病原体部が有するより詳細な菌株データ（MLVA データ）を連携させるシステムの開発を行い、統合したデータの効果的な活用方法について検討する。これにより、事例発生時の調査及び介入の迅速化が見込まれ、食品衛生行政上大きな貢献が期待出来る。

また、詳細な菌株データが得られていない初期の段階において、より早期に広域事例の疑いを探

知することを目的として、過去の報告数データとの比較から特異的な増加を自動で探知し、アラートを発出するシステムの開発を行う。広域事例疑いの早期探知と、探知後の継続的なモニタリングを行うシステムを構築し活用することで、事例発生時の初動調査及び介入の迅速化が見込まれ、食品衛生行政上大きな貢献が期待出来る。さらに実際の事例への適用についても一部行い、広域事例の探知、分析、および感染源の探索について活動し、事例探知後の調査手法の整備に関する検討を行う。

さらに、長期的な視点から、実際の広域事例の発生要因の調査について、食材そのものを管理する農林部局等との連携が欠かせないことが考えられる。具体的に、食品衛生分野における HACCP

との連携、農業分野における GAP との連携について、システムを幅広く含めていくための必要な情報を国内外から収集し、実装するシステムに一部具体的に反映させていくことを検討する。

B. 研究方法

(A) MLVA データと NESID データの連携と統合データの活用に関する検討

2017 年度に NESID データと MLVA データを突合させるためのプログラムを作成し、2018 年度には、効率的に作業ができるようにシステム化した。2019 年度は、統合されたデータの効果的な活用方法について検討した。

MLVA データと NESID データの突合アルゴリズムは、表 1 に示す項目 (1) ~ (5) について、全ての項目の合致条件を満たすものが NESID データの中に存在し、かつそれがひとつに絞られるとき、そのデータを機械的に突合させた。条件を全て満たすものが複数ある場合は、備考欄の記載内容等を活用して、目視によりその中から選択することとした。条件を全て満たすものがひとつもない場合は、合致する項目が多い順に候補のデータを出し (最大 10 例)、その中から目視により選択することとした。MLVA データにおいて、住所、年齢、性別のデータが欠損している場合は、NESID データの絞り込みができないため、突合不可能とした。

表 1. MLVA、NESID データの突合項目と合致条件

分類	MLVA データ項目	NESID データ項目	備考
(1) 住所	「患者等の住所(都道府県)」 「患者等の住所(市、郡、町村)」	「当録者住所」or 「上記病院・診療所の所在地」	・必須(記載がない場合はNG) ・市町村は、MLVA データの文字列が NESID データに含まれていれば一致とみなす
(2) 年齢	「年齢」	「診断時の年齢」	・必須(記載がない場合はNG) ・MLVA データの年齢表記に対応 n(歳)代=m~n+9 n歳未満=0~m-1 nカ(ヶ月)月=0. を一致とみなす
(3) 性別	「患者性別」	「性別」	・必須(記載がない場合はNG) ・MLVA データの性別表記に対応 M(半角/全角)→男 F(半角/全角)→女
(4) 発症日	「発症日」	「発病年月日」	・記載がある場合のみチェック ・7日以内のズレは許容する
(5) O血清型	「送付書のOHJ」 「感染研OHJ」 「157/111/28」 「Other」	「O入力欄」	・記載がある場合のみチェック

これらの作業を効率的に行えるように、自動突合の実行、候補の表示、候補の中からの選択を簡単にできるウェブツールを作成した。「症状」、「備考欄」の自由記載データ等、候補からの選択の際に参考になるデータを同時に出力するように工夫した。

統合データの活用法の検討の一環として、まずは広域の MLVA クラスタ (同一 MLVA complex の症例群) の規模別の発生頻度を調べた。簡単のため、ここでは 2 保健所以上にまたがる事例を広域発生と定義した。MLVA クラスタの規模は、NESID データにより家族内感染をクラスタ化し、1 家族クラスタを 1 としてカウントした。

(B) NESID データに基づく広域事例疑いの早期探知に関する検討

2017 年度にシステムの試作版を作成し、2018 年に試運用した。2019 年度は、2018 年度までの研究で得られた知見に基づき、アラート閾値の再検討等システムの改良を試みた。

本システムは、過去データから算出した患者報告数のベースラインと現在の報告数の比較により、特異な報告数増加を探知しアラートを発出するものである。ベースラインには、過去 5 年前後 1 週の 15 個 (3 週×5 年) の値の平均値を用いた。ただし、患者届出数のままでは単一曝露 (ポイント・ソース) の集団発生による報告数増加が含まれるため、できる限り単一の場所で発生した集団発生事例 (家族内感染を含む) をクラスタ化し、一つの集団発生事例を一つのイベントとしてカウントする方法を用いた (高原他 IASR (1) 参照)。集団発生による患者増加の影響を除いた散発症例の増加に注目することにより、広域食中毒による患者増加の可能性を探知する。過去と比較し特異な増加であることを示すアラート閾値は、週当たりのイベント数とベースラインからの逸脱度を組み合わせて段階的に設定した (図 1)。この閾値と対応は、2018 年データによる試行の結果、迅速性、発生頻度等を勘案して決定したものである。

図 1. 2019 年に用いたアラート閾値設定と各レベルに達した時の対応

		ベースラインからの逸脱度	
		+1以上2SD未満	+2SD以上、または、二週連続1SD以上
患者イベント数/週	1~9件	Lvl. 1	
	10~19件	Lvl. 2	Lvl. 3
	20件~	Lvl. 2+	Lvl. 4

各レベルに達したときの対応

レベル	対応
レベル 2 以下	感染研感染症疫学センター内で監視強化
レベル 3	場合によっては厚生労働省 (医薬・生活衛生局食品監視安全課等) に情報提供 →重症度、地理分布や年齢・性別分布の偏りなどを考慮し総合的に判断する
レベル 4	厚生労働省 (医薬・生活衛生局食品監視安全課等) に情報提供

2019 年 6 月からこのアラート閾値によりシステムを稼働させた。

(C) 実際の事例への対応について

(B) において開発したツールにより、某自治体を中心とする実際の事例を探知し、公衆衛生上

の対応を行った。

(D) 海外における食中毒調査に関する疫学・病原体情報の連携に関する情報収集

2017年度については、オーストラリア連邦政府保健省 (Australian Government Department of Health) からの紹介で、オーストラリア・メルボルンで2018年3月27-28日開催された、OzFoodNetに関係する疫学者の会議にオブザーバーとして、同国における食品媒介感染症・食中毒事例における疫学・病原体情報の評価・情報共有を行う場でのやり取りに参加した。

(倫理面への配慮)

疫学情報に含まれる個人情報の保護に十分な配慮しながら実施した。NESID 患者データからは氏名、生年月日、住所の市町村以降のデータを削除し匿名化した上で解析に使用した。

C. 研究結果

(A) MLVA データと NESID データの連携と統合データの活用に関する検討

2018年5~10月のMLVA データ (自治体によるNESID-IDの記載がなかった992件)のうち、自動で突合できたものは650件 (約66%)であった。残りの352件のうち、備考欄や症状等のデータを参考にして手動で突合ができたものが149件、データ不足により突合不可能であったものが193件であった。

また、MLVA クラスターの規模別の発生頻度を見ると、規模 (同一クラスターに含まれる症例または家族クラスターの数) が2の事例が最も多く、規模が大きくなるにつれて発生頻度は減少した。規模が9以上で発生頻度は大きく低下し、それ以上の規模の事例は合計7回であり、全体の発生回数 (84回) の約8%であった。

(B) NESID データに基づく広域事例疑いの早期探知に関する検討

2019年6月から図1の閾値を用いてシステムを稼働させた結果、アラートレベル1以上が24回発生した。うち、最終的にレベル3まで至った事例が3回、レベル4まで至った事例が2回発生した。レベル3以上のうち4回のアラートで、厚生労働省 (食品監視安全課及び結核感染症課) への情報提供を実際に行った (026VT2・20週, 0145VT2・36週, 0157VT1VT2・44週, 0157VT2・46週)。なお第20週の026VT2は、システムがレベル3として探知する数日前に感染症疫学センター内のEHEC監視チームが探知し、早めの情報共有に至った。レベル3として探知された第36週

の0145VT2は、報告地分布に偏りがみられたことを考慮し、情報提供に至った。第46週の0157VT2もレベル3で探知したが、性別・年齢分布の偏りと直近の報告の増加傾向を考慮して早めの情報提供を行った (最終的にはレベル4に到達)。

(C) 実際の事例への対応について

2018年8月 (第35週) に某自治体を中心とする0157VT2 散发例 (イベント数) の増加を、システムが探知した。自治体による事例探知時点で、可能性のある食材の除去等がなされていなかった。自治体とのやり取りを行い、症例定義を設定し記述疫学を実施した。本事例の詳細については自治体による詳細な情報の公表、及び食中毒としての行政対応が行われていないことから詳細については触れない。記述疫学に加え、患者の所有していた購入食料品に関する電子情報等から喫食と発症の関連について解析疫学を実施し、特定の野菜について関連の可能性を見出した。遡り調査の結果は特定の産地の可能性を示唆するものであった。産地の可能性を示唆された自治体の農業関連組織を訪問し、当該野菜の栽培・収穫・流通等に関する情報を収集した。肥料の使用方法等を含め、野菜そのものが汚染された可能性は極めて低いものの、井戸水等の使用については情報がなかった。また、流通時のコールドチェーンや意図しない長期保存の問題等が残った。

(D) 海外における食中毒調査に関する疫学・病原体情報の連携に関する情報収集

2018年3月27-28日にかけて、オーストラリアで開催された食中毒に関する疫学・病原体情報の評価・情報共有を行うOzFoodNetの会議に参加した。

参加者は各州の各州に配属されている疫学者、ラボ担当者、食品標準化部門、農水部門、感染症サーベイランス担当者であり、日本からは駒瀬、高橋が参加した。他に米国から参加者があった。今回の主たる議題は全ゲノム解析の導入について、その利点、弱点、サーベイランスでの活用などで、どのような状況で用いるのが効果的であるかについてのグループディスカッションが行われた。日本の食中毒対応の状況について簡単な報告を行った。具体的な内容としては、日本における、食中毒と感染症の扱いの違い、食中毒部門と感染症部門、複数自治体間、地方自治体と国の情報共有の重要性について議論した。

また、2017年のEHECアウトブレイクについて、2つのピークについて、最初の散发事例 (ピーク) 早期探知が課題であることを示した上で、対策として実施される予定となっていることの紹介と

して、自治体間と国の協議会を設置すること、ガイドラインの改正、共通 ID の導入、地方衛生研究所（以下、地衛研）での MLVA 導入について議論した。これらの報告に、以下のようなコメントが寄せられた。

- ・ 探知は OzFoodNet の疫学者が情報共有を定期的に行っていることにより成立する

- ・ 検査情報と疫学情報はオーストラリアでは州レベルで統合される（いくつかの州では自動照合）

- ・ 州の DB から国に決まった情報が報告される（州と国の間では、どのような情報が提供されるか、取り決めに従う）

また、OzFoodNet の概要についての説明を受けた。OzFoodNet は 2000 年に設立され、国が資金を提供している州をまたがる組織である。各州に配属されている疫学者、ラボ担当者、食品標準化担当、農水部門等の担当者などからなる。毎週のリモート会議で州ごと食中毒の発生状況について報告し、疫学担当メンバー間で情報共有される。年に 3 回は全体の Face-to-Face のミーティングを実施する。また、異常が発生した場合は、他の OzFoodNet メンバーに迅速にメールで情報共有し、食中毒情報は各州から国のシステムに報告する枠組みとなっている。

いくつかの州（NSW、Victoria）では、州の DB から患者情報、疫学情報、ラボ情報が自動的に国のシステムに報告される。これらの異常探知は目視と 5 年平均・SD を利用している。また、州における情報の統合についてはラボに送られる検体は個人情報つきであり、ラボから対象者に対して直接問い合わせが可能となっており、個人情報を元に疫学情報と検査情報が州レベルの DB 上で自動的に統合される。

D. 考察

(A) MLVA データと NESID データの連携と統合データの活用に関する検討

MLVA データと NESID データの紐づけが効率的に行えるようになったことから、連携されたデータの効果的な活用方法に関する検討が重要な課題である。MLVA クラスターの規模別の発生頻度を調べたところ、規模が 9 以上の事例の発生回数は 7 回（全体の約 8%）であり、発生頻度の低い稀な事象であると考えられた。これらの事例の迅速な探知と効果的な注意喚起のための方法論を検討を引き続き行っていく必要がある。

(B) NESID データに基づく広域事例疑いの早期探知に関する検討

広域事例疑いを早期に探知することができれ

ば、事例発生時の調査および介入の迅速化が見込まれ、食品衛生行政上の貢献が期待出来る。NESID の届出データを用いた広域事例疑いの早期探知の取り組みにより、2019 年においては、広域事例の疑いとして厚生労働省への情報提供を 4 回実施し、複数の自治体に対する喫食状況調査等の早期の実施に結びつけることができた。なお、2019 年に用いたアラート閾値（図 1）は 2018 年実績に基づく暫定的なものである。感度、特異度、発生頻度等のバランスを考慮しつつ、より迅速に探知するための閾値設定の再検討を行う必要がある。また、迅速探知により早められた調査開始を汚染源の同定につなげるための全体のスキームについて、関係機関との調整を含めた検討を行うことも今後の課題である。

(C) 実際の事例への対応について

開発したシステムによる重要な広域の可能性の高い事例を探知する試みは有効に機能したと考えられた。ただし、従来通りの制約、すなわち、疫学的な分析結果では原因として断定するには至らず、自治体による初動時点での関連する可能性のある食材を如何に迅速に確保出来るかということが必要であることが分かった。さらに、食材（特に野菜）が汚染されるプロセスを知り、原因究明と対応改善につなげるためには、野菜の衛生管理指針の理解に基づく中長期的な連携関係の構築が必要であると考えられる。

(D) 海外における食中毒調査に関する疫学・病原体情報の連携に関する情報収集

オーストラリアにおける OzFoodNet の視察の結果、日本とは異なる点として、全国レベルでの情報共有が日本に比べて頻繁に行われておることが確認された。OzFoodNet 所属の疫学者が各州に配置され、緊密に情報連携が行われていること、ラボ検体は原則個人情報つきで提供されるため、疫学情報、患者情報との統合が容易である事がその原因と考えられる。また、オーストラリアでの食中毒対策は、国レベル、州レベルで実施される。そのため、全国共通調査表や州や国でのシステム上のデータフォーマットに関して詳細を把握することが重要であると思われた。これらについては引き続き情報交換を進めることについて、合意した。提供された情報に基づき、日本において有用な点を今後検討する。

E. 結論

本分担グループでは、患者（NESID）データと菌株（MLVA）データの連携とその活用、広域事例の早期探知と継続的なモニタリングを行うため

のシステムの構築を目的とし、主に MLVA-NESID データ突合システムの構築、NESID データに基づく広域事例疑似探知システムの構築と改良を行った。今後も、継続的にこれらのシステムの改良を行う。また、長期的な視点から、実際の広域事例の発生要因の調査について、食材そのものを管理する農林部局との連携が欠かせないことが考えられる。具体的に、食品衛生分野における HACCP との連携、農業分野における GAP との連携について、システムを幅広く含めていくための必要な情報を国内外から収集し、実装するシステムに一部具体的に反映させていくことを検討する。また、実際の事例を通じた改善も重要であり、積極的に対応していく。

【参考文献】

- 1) IASR Vol. 37 p. 161-162 「牛生肉・牛生レバー規制強化後の牛生肉および牛生レバーを原因とする腸管出血性大腸菌 0157 発生状況」

<https://www.niid.go.jp/niid/images/iasr/2016/08/438d03t01.gif>

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					